

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Varje Kass

**Valk Mgm101 ja selle deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja PhD Tiina Sedman

TARTU 2016

## INFOLEHT

### Valk Mgm101 ja selle deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele

Valk Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*) on *Saccharomyces cerevisiae* Rad52-tüüpi valk, mis on vajalik mitokondriaalse DNA (mtDNA) stabiilsuse säilitamiseks. Zuo *et al.* 2002. aasta artiklis on näidatud, et Mgm101 on vajalik metsiktüüpi ja neutraalsete hingamismutantide mtDNA säilitamiseks. Samas töös on väide, et Mgm101 pole vajalik hüpersupressiivsetele mutantidele, mis sisaldavad *ori/rep*-järjestusi, sest need säilitavad stabiilse mtDNA Mgm101 deletsiooni korral. Käesolevas töös vaadeldi kahte *ori/rep*-järjestust sisaldavat tüve A11 ja A1184 ning vastandudes Zuo tulemustele selgus, et mõlema tüve mtDNA stabiilsus on häiritud valgu Mgm101 deletsioonist.

Märksõnad: mitokondriaalne DNA, valk Mgm101, mtDNA stabiilsus, pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS kood: P320 (Nukleiinhappe süntees, proteiini süntees)

### Protein Mgm101 and its deletion impact on the stability of mitochondrial DNA

Protein Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*) is *Saccharomyces cerevisiae* Rad52-type protein, which is necessary to maintain the stability of mitochondrial DNA. Previously, it has been claimed (Zuo *et al.*, 2002), that Mgm101 is necessary for the stability of mtDNA in wild-type  $\rho^+$  and neutral  $\rho^-$  mutants but not for hypersuppressive mutants containing *ori/rep* sequence because as these mutants appeared to maintain stable mtDNA without Mgm101. In this thesis two hypersuppressive strains – A11 and A1184 – with *ori/rep* sequence were analyzed and the results showed that the disruption of Mgm101 affected mtDNA stability in both strains contradicting previous results by a different group.

Keywords: mitochondrial DNA, protein Mgm101, mtDNA stability, baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS code: P320 (Nucleic acid synthesis, protein synthesis)

## SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Mitokonder .....	7
1.2 Mitokondriaalne DNA .....	7
1.3 Pärmseente hingamismutandid .....	9
1.4 Mitokondriaalse DNA replikatsioon .....	11
1.5 Mitokondriaalse DNA reparatsioon .....	14
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mudelorganismina .....	16
1.7 mtDNA stabiilsust mõjutavad valgud .....	17
1.8 Valk Mgm101 .....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	21
2.1. Töö eesmärgid .....	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Kasutatud plasmiidid, pärmitüved ja söötmed .....	21
2.2.2. Kasutatud praimerid ja PCR reaktsioonid .....	23
2.2.3. PCR produktide puhastamine .....	26
2.2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tüvede tegemine kasutades liitiumatsetaadi transformatsiooni protokolliga .....	27
2.2.5. DNA eraldus liitiumatsetaat meetodil (Lööke <i>et al.</i> , 2011) .....	28
2.2.6. Pärmigeenoomse DNA eraldus .....	28
2.2.7. DNA restriksioon .....	29
2.2.8. Agaroosgeelelektroforees ja DNA kandmine nailonfiltrile ( <i>Southern blot</i> ) .....	29
2.2.9. Radioaktiivsete proovide valmistamine ja hübridatsioon.....	30
2.3. Tulemused ja arutelu .....	32

2.3.1. MGM101 ja STE5 geenide deletsioonitüvede valmistamine HSp <sup>-</sup> tüvedes .....	33
2.3.2. Tüve A1184 ning deletsioonimutantide DNA analüüs .....	37
2.3.3. Tüve A11 ning deletsioonimutantide analüüs .....	40
2.3.4. Arutelu .....	42
KOKKUVÕTE .....	44
SUMMARY .....	45
KASUTATUD KIRJANDUS .....	46
LISAD .....	53
LIHTLITSENTS.....	56

## KASUTATUD LÜHENDID

BER – lämmastikaluste väljalõige (*base excision repair*)  
CO – ristsiire (*crossover*)  
DSB – kaheaahelaline katke DNA ahelas (*dual-stranded break*)  
DSBR – kaheaahelalise katke parandus (*double-strand break repair*)  
EtBr – etiidiumbromiid  
hph – antibiootikum hügromütsiin B  
HR – homologiline rekombinatsioon (*homologous recombination*)  
HSp<sup>-</sup> – hüpersupressiivne pärmitüvi (*hypersuppressive*)  
kb – tuhat aluspaari (*kilo basepair*)  
LiOAc – liitiumatsetaat  
MMR – valepaardumiste parandamine (*mismatch repair*)  
mtDNA – mitokondriaalne DNA (*mitochondrial DNA*)  
Np<sup>-</sup> – neutraalne pärmitüvi (*neutral*)  
NER – parandus nukleotiidi väljalõikamisega (*nucleotide excision repair*)  
NHEJ – omavahel mittehomoloogiliste kaheaahelaliste katkete liitmine (*non-homologous end joining*)  
nt – nukleotiid  
ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)  
ori/rep – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)  
RC mudel – veereva ratta mudel (*rolling circle model*)  
 $\rho(\text{rho})^-$  – pärmitüvi, mis mtDNA deletsioonide tõttu ei ole võimeline mitokondriaalseks geeniekspressiooniks  
 $\rho(\text{rho})^+$  – pärmitüvi, milles mitokondri funktsioneerib normaalselt, fenotüübiliselt wt  
 $\rho(\text{rho})^0$  – pärmitüvi, mis on kaotanud oma mtDNA  
SDSA – sünteesist sõltuv ahelaparandus (*synthesis-dependent strand-annealing*)  
Sp<sup>-</sup> – supressiivne pärmitüvi (*suppressive*)  
SSB-alk – üksikaahelalise DNA-ga seonduv alk (*single-stranded DNA-binding protein*)  
ssDNA – üheaahelaline DNA (*single-stranded DNA*)  
wt – metsiktüüpi pärmitüvi (*wild type*)  
YPD – glükoosi sisaldav tardsööde

## SISSEJUHATUS

Mitokondriaalne DNA kodeerib mitokondri tööks vajalikke valke ja seetõttu on selle stabiilsus mitokondri tööks äärmiselt vajalik. Siiski on organisme, kes on võimelised üle elama mtDNA deletsioone või sootuks selle kadu. Nende hulgas ka käesoleva töö uurimisobjekt *Saccharomyces cerevisiae* (pagaripärm).

Pagaripärm on laialdaselt kasutatav mudelorganism oma kättesaadavuse, ohutuse, eetilise ja kõrge uurituse taseme tõttu. Pagaripärmi jaotatakse mtDNA sisalduse põhjal  $\rho^+$ ,  $\rho^-$  ja  $\rho^0$  tüüpi tüvedeks.  $\rho^+$  ehk wt (metsiktüüpi) tüvedes on normaalselt funktsioneeriv mtDNA,  $\rho^-$  tüvedes on mtDNAs toimunud deletsioonid ja  $\rho^0$  tüüpi tüvedes puudub mtDNA täielikult.

mtDNA stabiilsuse eest vastutab suur hulk valke, mille ülesanded varieeruvad replikatsioonist reparatsioonini.

Valk Mgm101 on vajalik mtDNA säilitamiseks, täites ülesandeid DNA sidumises, parandamises ja paljundamises. Mgm101 on vajalik oksüdatiivselt kahjustunud mtDNA parandamisel. Mgm101 osaleb replikatsioonis ja võimalik, et ka telomeeride säilitamisel (Pevala *et al.*, 2016).

Zuo ja kaasautorite 2002. aasta artiklist järeldus, et Mgm101 on vajalik pagaripärmi wt rakkude ja  $N\rho^-$  hingamismutantide mtDNA säilitamiseks, aga pole vajalik  $HSp^-$  tüvedele, kus mtDNA fragment säilis vaatamata MGM101 geeni deleteerimisele.

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida valgu Mgm101 mõju mtDNA stabiilsusele  $HSp^-$  tüvedes A11 ja A1184. Selleks loodi deletsioonitüved, millest valiti kaheksa kolooniat, millest eraldati DNA ja viidi läbi mtDNA analüüs.

Lõputöö valmimise eest soovin tänada oma lõputöö juhendajat PhD Tiina Sedmani, kes oli igakülgset toeks nii laborikatsetes kui ka kirjutamisel. Samuti soovin tänada oma laborikaaslast Tartu Ülikooli Üldise- ja mikroobibiokeemia laborist, eriti vanemlaboranti Maie Looritsat ja professor Juhan Sedmani. Suur tänu läheb ka mu kursusekaaslasele Mari-Liis Süllale, kellega kõrvuti katseid tegime. Soovin oma lõputöö pühendada oma perele, kes hoolimata kõigest julgustasid mind edasi minema. Tänan oma õde Virve Kassi keelelise toe ja noormeest Allan Kustavust pilditöötuse abi eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Mitokonder

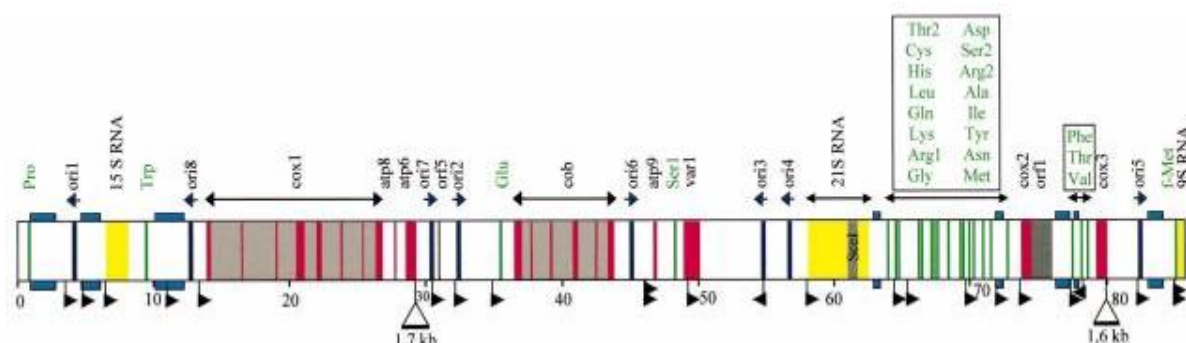
Mitokonder on eukarüootse raku organel. Mitokonder on ümbritsetud kahe membraaniga ning tal on oma genoom. Kahe membraani tõttu on mitokonder jagatud kompartmentideks: välismembraan, membraanidevaheline ruum, sisemembraan ja selle sissesopistused ehk kristad ning maatriks (Chance, 1963). Lisaks on pärmis mitokondri struktuuris tähtis roll MAM-il (*mitochondria-associated membrane*) – mitokondriga seondunud endoplasmaatilise retiikulumi membraanil, mis osaleb raku füsioloogias ja homeostaasis (Gaigg *et al.*, 1995). Mitokondrid on suuruselt sarnased bakteritega: nende läbimõõt jääb vahemikku 0,5-1,0 µm (Parthasarathi *et al.*, 2002). Mitokondrite põhiülesandeks on raku energiaga varustamine – mitokondri sisemembraanil toimub oksüdatiivse fosforüülimise tulemusel energia talletamine ATP-na. Samuti on väga oluliseks ülesandeks Fe-S klastrite kokkupanek mitokondris (Lill *et al.*, 2012). Veel on mitokondrid seotud signaliseerimisega, antiviraalsete vastustega, raku diferentseerumisega, rakusurma (apoptoosi), rakutsükli ja rakukasvu kontrollimisega (McBride *et al.*, 2006). Mitokondrid osalevad heemi, aminohapete ja nukleotiidide biosünteesis, uurea tsükli, rasvhapete metabolismis ning ROS-ide (reaktiivsed hapnikuühendid) tekkes (ülevaade Kaniak-Golik ja Skoneczna, 2015).

## 1.2 Mitokondriaalne DNA

Mitokondritel on oma DNA – mtDNA (mitokondriaalne DNA). Mitokondrite geneetiline materjal on lihtsustunud, seetõttu kodeeritakse mitokondris vaid vähesel hulgal valke (Truscott *et al.*, 2003). Enamik mitokondrile vajalikke valke on kodeeritud tuumas, sünteesitud tsütoplasmas ja seejärel transporditud mitokondrisse (Neupert, 1997). mtDNA genoomi suurus on väga varieeruv - pagaripärmi mitokondriaalne genoom on 85kb (Foury *et al.*, 1998), samas kui inimese oma on 16,5 kb suurune (Anderson *et al.*, 1981). Kuigi pärmi mtDNA on suurem kui inimestel, on see geenivaesem (Shadel, 1999). Seega on pärmi mtDNA-s geenide vahel pikad mittekodeerivad DNA-järjestused. Imetajate mtDNA on rõngasmolekul, aga taimede-pärmi mtDNA on enamasti lineaarne (Shadel, 1999). Inimese mtDNA kodeerib 13 OXPHOS(*oxidative phosphorylation*)-seoselist mRNA-d, 22 tRNA-d ja 2 rRNA-d (Anderson *et al.*, 1981).

Pagaripärmi mtDNA on sekveneeritud, see koosneb 85779 aluspaarist (nt), sisaldab 7 hüpoteetilist ORF-i, tsütokroom c oksidaasi alaühikuid I, II ja III (*cox1*, *cox2* and *cox3*), ATP

süntaasi alaühikuid 6, 8 ja 9 (*atp6*, *atp8* and *atp9*), apotsütokroom b (*cytb*) ning ribosomaalset valku (*var1*) (Foury *et al.*, 1998). Seega kodeerib *S. cerevisiae* mtDNA seitset oksüdatiivseks fosforülatsiooniks vajalikku valku ning kahte rRNAd, 24 tRNAd, üht mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku valku ja ühte 9S RNAd (vt. Joonis 1) (Foury *et al.*, 1998).



**Joonis 1. Tüve FY1679 sekveneerimisel saadud mtDNA lineaarsel kujul kujutatuna.**

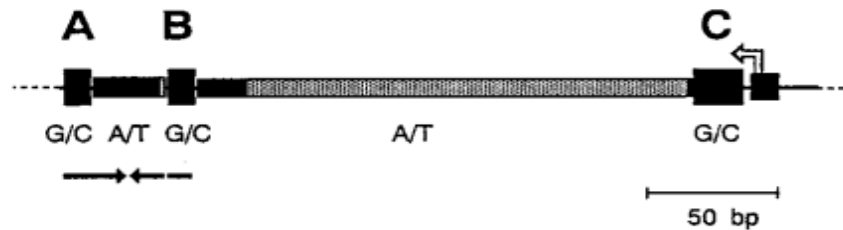
Halliga on märgitud intronid ja intronitega seotud ORF-id; punasega eksonid ja valke kodeerivad geenid; rohelisega tRNA-d; tumesinisega *ori*-elemendid; kollasega 9S, 15S ja 21S RNA-d; helesinisega lüngad, mis antud artiklis mtDNA kaardil täideti. Seest valged kolmnurgad tähistavad kaht suurt deletsiooni (võrreldud poolikult sekveneeritud tüvega D273-10B) (positsioonides 29295 ja 80030). Mustad kolmnurgad tähistavad transkriptsiooniinitsiatsiooni saite (kokku leiti neid 19) ning kolmnurkade suund tähistab transkriptsiooni suunda. Näidatud on ka mtDNA poolt kodeeritavad hingamisahela komponendid: tsütokroom c oksüdaasi (kompleks IV) subühikuid I, II ja III (*cox1*, *cox2*, *cox3*);  $F_1F_0$  -ATPaasi (kompleks V) subühikuid 6, 8 ja 9 (*atp6*, *atp8*, *atp9*); apotsütokroom b (kompleks III) (*cytb*); ribosomaalne valk *var1*. Joonisel on näidatud 7 replikatsiooni *ori*-sarnast elementi ning 21S ja 15S ribosomaalsed RNA-d (15S RNA, 21S RNA). Veel on joonisel 24 tRNA-d ja RNAas P komponent 9S (9S RNA). (Foury *et al.*, 1998)

mtDNA on pakitud valk-DNA kompleksidesse - nukleoididesse (Miyakawa *et al.*, 1987). Osa nukleoidide on seotud mitokondri sisemise membraaniga ja enamus paiknevad ühtlaselt üle retiikulumi (Garrido *et al.*, 2003). Pärsi iga nukleoid sisaldab 1-10 koopiat mtDNA-d (Chen ja Butow, 2005).

Pagaripärsi mtDNA omapäraks on kõrge adenosiin-tümidiini (AT) sisaldus (~82%), kusjuures enamik AT ja guanosiin-tsütosiini (GC) paare paiknevad rühmiti: suured (150-1500bp) AT-rikkad järjestused vahelduvad lühemate (50-80bp) GC-klastritega (Grossman *et*



al., 1971). Olenevalt pärmi tüvest on mtDNA-s 7-8 *ori/rep*-järjestust, mis sisaldavad kolme konserveerunud GC-rikast plokki (A, B ja C) ning on üksteisest eraldatud AT-aladega (vt. Joonis 2) (Foury *et al.*, 1998). Ent üksnes nelja *ori/rep*-järjestust (1, 2, 3 ja 5) peetakse aktiivseks, sest neil on olemas transkriptsiooni promootor (Baldacci ja Bernardi, 1982).



**Joonis 2. *ori/rep* järjestuse ehitus.** Lühikesed GC-rikkad A, B ja C plokid on üksteisest eraldatud pikemate AT-aladega. Mustaga on tähistatud elemendid, mis on 100% konserveerunud transkriptsiooniliselt aktiivsete *ori/rep*-alade vahel, halliga on vähemal määral konserveerunud alad. Valge nool tähistab promootorit ja näitab transkriptsiooni suunda. Mustad nooled näitavad ümberpööratud järjestusi plokkides A ja B ning nende vahel olevat AT järjestust. (Lorimer *et al.*, 1995)

mtDNA sisalduse põhjal jaotatakse pagaripärm  $\rho^+$  metsiktüübiks (wt – *wild-type*) ning  $\rho^-$  ja  $\rho^0$  mutantideks (Nagley ja Linnane, 1970). wt ehk  $\rho^+$  rakkudes on säilinud normaalne mtDNA.  $\rho^-$  -l on mtDNAs toimunud deletsioonid ning  $\rho^0$  rakkudes puudub mtDNA sootuks (Blanc ja Dujon, 1980).

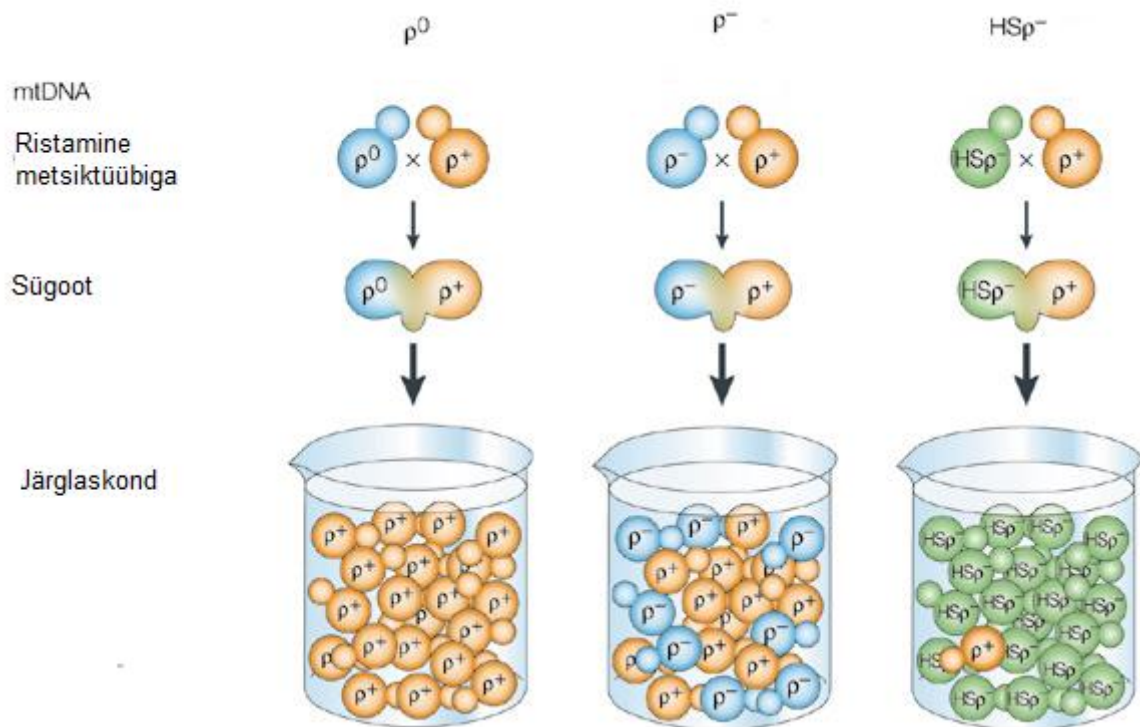
### 1.3 Pärmseente hingamismutandid

*Petite*-positiivsetel pärmidel, näiteks *Saccharomyces cerevisiae*’l on omapärane võime püsida elujõulisena pärast mtDNA deletsioone (Kominsky ja Thorsness, 2000). Mutantide teke on loomulik fenomen, esinedes pagaripärmi laboritüvede puhul 1-2%-il ühe generatsiooni rakkudest. Mutantide esinemissagedust on võimalik suurendada keemiliste manipulatsioonidega (näiteks töötlus etiidiumbromiidiga), UV-kiirgusega, näljutamisega, ebasobiva temperatuuriga ja valguhäiringutega (Heude *et al.*, 1979).

Pärmseente hingamismutantides on mitokondriaalne genoom täielikult või osaliselt kadunud, seetõttu pole nad võimelised kasvama mittefermenteeritaval süsiniku allikal (nt. glütseroolil) (Nagley ja Linnane, 1970). Selliseid mutante nimetatakse  $\rho$ -mutantideks ja pärmide mtDNAd

$\rho$ -faktoriks (Williamson, 2002). Mutantide teket saab kontrollida glükoosirikkal söötmel: wt ( $\rho^+$ ) pärmirakud moodustavad suuri kolooniaid, aga mutandid moodustavad kääbuskolooniaid (*petite*-kolooniad), sest neil puudub funktsionaalne hingamisahel (Nagley ja Linnane, 1970). Kääbusmutantide aeglasem kasv on tingitud sellest, et neil puudub oksüdatiivse fosforüleerimise metabolismirada (34ATP-d ühe glükoosi molekuli kohta), ATP-d toodavad nad glükolüüsi ja etanoolkäärimisega (2ATP-d ühe glükoosi molekuli kohta) (Blanc ja Dujon, 1980).

$\rho^0$ -des võib mitokondriaalne genoom kaduda erinevatel põhjustel, näiteks on toimunud deletsioonid tuumageenides, mis kodeerivad valke, mis on vajalikud mtDNA replikatsiooniks (DNA polümeraas  $\gamma$ , Mip1p, ssDNA-siduv valk, Rim1p, Cdc9p) või on punga sattunud defektne mtDNA (Zuo *et al.*, 2002).  $\rho^-$ -des deletsioonist puutumata jäänud DNA fragmendid amplifitseeritakse ning saadakse wt-ga umbes sama hulk mtDNA-d (MacAlpine *et al.*, 2001). Sõltuvalt deleteerunud osast jagunevad  $\rho^-$ -mutandid neutraalseteks ( $N\rho^-$ ), supressiivseteks ( $Sp^-$ ) ja hüpersupressiivseteks ( $HSp^-$ ) (Ephrussi ja Grandchamp, 1965).  $N\rho^-$ -rakkude ristamisel wt-ga on järglaskond wt genoomiga,  $Sp^-$  korral on järglaskonnas rohkem mutante kui wt rakke ja  $HSp^-$  korral on kuni 100% järglastest  $\rho^-$ -rakud, seega on hüpersupressiivsus (HS) pärilik tunnus (Blanc ja Dujon, 1980). Hingamismutantide pärandumisest annab ülevaate joonis 3.  $HSp^-$  mutantide genoomid sisaldavad konserveerunud ja promootoriga aktiivset *ori/rep*-järjestust, samas pole teada, kas *ori* (*origin of replication*) annab segregatsiooni või replikatsiooni eelise (MacAlpine *et al.*, 2001).



**Joonis 3. Hingamismutantide ristamine metsiktüvega.**  $\rho^0$ -mutantide ristamisel wt-ga on tulemuseks ainult wt rakud.  $\text{Sp}^-$  ristamisel wt-ga on tulemuseks nii supressiivsed kui ka metsiktüüpi rakud.  $\text{HSp}^-$  ristamisel wt-ga on tulemuseks valdavalt (>95%) HS rakud. Seega on antud tunnuse pärilikkus mittemendellik. Joonis on illustratiivne ega esinda reaalselt järglaste suhet. Joonis on kohandatud eestikeelseks Williamsoni 2002. aasta artikli põhjal.

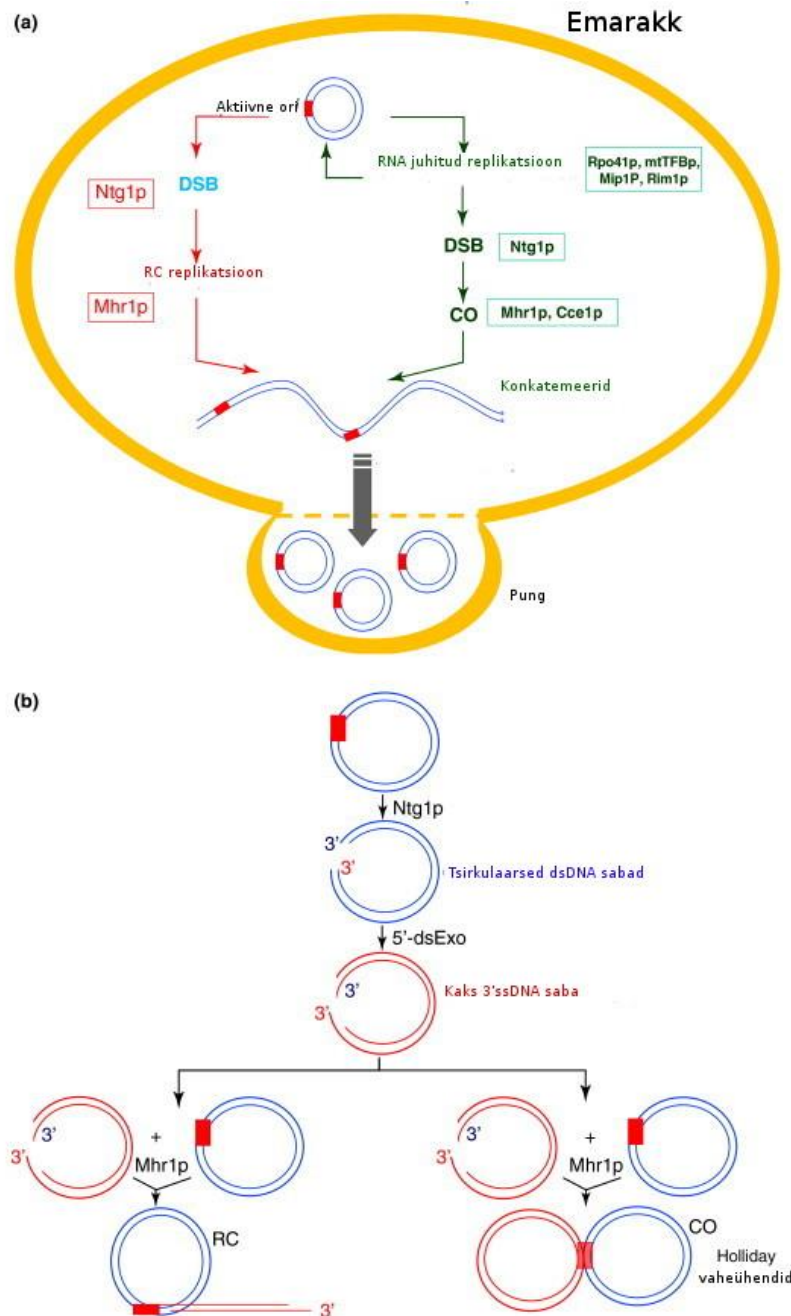
#### 1.4 Mitokondriaalse DNA replikatsioon

Mitokondritel on oma replikatsiooni-, transkriptsiooni- ja translatsiooniparaat. Erinevalt ainult S-faasis toimuvast tuuma DNA replikatsioonist, toimub mtDNA replikatsioon kogu rakutsükli vältel, aga eelkõige on replikatsioon vajalik rakkude pooldumisel (Bogenhagen ja Clayton, 1977). Imetajate mtDNA replikatsiooniks on vajalik DNA polümeraasi  $\gamma$ -kompleks, mis koosneb kahest subühikust (suurustega 140 kDa ja 55 kDa) (St. John *et al.*, 2010). Lisaks polümeraasile osalevad imetajatel replikatsioonis DNA helikaas TWINKLE (kerib kaheaheelalise DNA lahti üheaheelaliseks), SSB-valgud (*single-stranded DNA binding proteins*) ja mitokondriaalne RNA polümeraas (Jemt *et al.*, 2011). TWINKLE, polümeraas- $\gamma$  ja SSB-valgud moodustavad replisoomi kompleksi (Jemt *et al.*, 2011). Kuna mtDNA replisoom koosneb vähestest osadest, saab seda järgi teha *in vitro* tingimustes (Korhonen *et*

*al.*, 2004). Clayton kaasautoritega (1982) on imetajate replikatsioonimehhanismiks välja pakkunud asünkroonse ahelaasenduse, kus osalevad ühesuunalised juhtiva ( $O_H$ -heavy) ja mahajääva ahela ( $O_L$ -light) replikatsiooni alguspunktid. Replikatsioon algab  $O_H$ -lt ja moodustub pikk ssDNA regioon kuni  $O_L$ -ni, kust seejärel toimub vastasahela sünteesi initsiatsioon (Clayton, 1982). Uuemad tööd on aga välja pakkunud, et replikatsioon on ahelasünkroonne ja kahesuunaline (Holt *et al.*, 2000). Varasemad tulemused võisid olla moonutatud artefaktide poolt, sest topoloogilise analüüsi tõlgendamine sõltub nukleiinhapete ekstaheerimismeetodist (Pohjoismäki *et al.*, 2010).

Pärmi on mtDNA replikatsioonimehhanism osaliselt veel hüpoteetiline. Välja on pakutud transkriptsioonist sõltuv (Maleszka *et al.*, 1991) ja rekombinatsiooni juhitud replikatsioonimudel (Ling *et al.*, 2007). Pärmi 7-8 *ori/rep*-järjestusest nelja peetakse replikatsiooni initsiaatoriteks (de Zamaroczy *et al.*, 1984). Algselt peeti võimalikuks veereva ratta mudelit, mida toetab kolm avastust: enamik pärmi mtDNA-st on lineaarne, selles esinevad lasso-struktuurid ja rõngad ssDNA sabaga (Maleszka *et al.*, 1991). Viimaste olemasolu vihjab sellele, et mahajääva ahela süntees ei pea sammu juhtiva ahela omaga, vaid moodustatakse Okazaki fragmentidena (Maleszka *et al.*, 1991). Pagaripärmi põhjal on välja töötatud mtDNA replikatsiooni initsiatsioonimudel, milles osalevad Mip1p (mtDNA polümeraas  $\gamma$ ), Rim1p (ssDNA-d siduv valk), Rpo41p (mitokondriaalse RNA polümeraas) ja Mtf1p (mitokondriaalse transkriptsiooni faktor) (Graves *et al.*, 1998). Rpo41p sünteesib lühikese RNA praimeriga ahela ja promootorita ahela alguse sünteesib hüpoteetiline primaas, seejärel Mip1p kasutab RNA praimereid, et pikendada uusi DNA ahelaid (Graves *et al.*, 1998). Vaata joonis 4.

Teise replikatsioonimehhanismi variandina on välja pakutud homoloogilisest rekombinatsioonist algatud replikatsioon, mis sarnaneb bakteriofaagi T4 replikatsiooni mudelile (Ling *et al.*, 2000). Rekombinatsiooni-juhitud replikatsioon sai kinnitust Gerholdi ja kaasautorite (2010) töös *Candida albicans*'iga. Varasemad uuringud on tehtud peamiselt pagaripärmi  $p^-$ -mutanditega (ülevaade Contamine ja Picard, 2000) ja võivad seetõttu erineda wt mtDNA topoloogiliste uuringute tulemustest. Veel on katseid tehtud *Candida parapsilosis*-ga, nendest selgus, et mitokondriaalsed telomeerid on rekombinatsiooni juhitud replikatsiooni *hot spot*-ideks (Gerhold *et al.*, 2014). Vaata joonis 4.



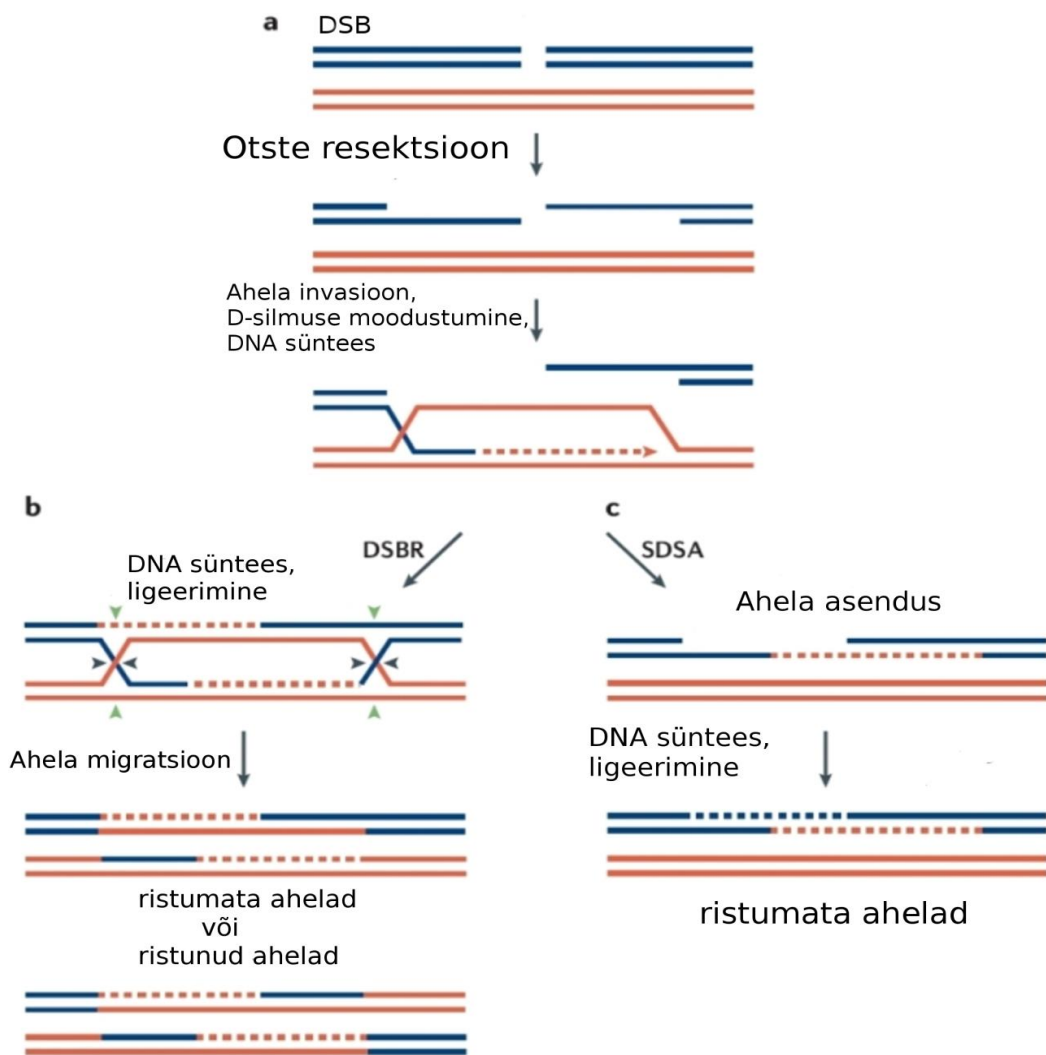
**Joonis 4. mtDNA replikatsiooni mudelite variandid pagaripärmis.** (a) Replikatsioon algab aktiivselt *ori*-lt, kui Ntg1p teeb kaheaheelalise katke (DSB). Punasega on näidatud veereva ratta (RC – *rolling circle*) mudel ja rohelisega RNA juhitud replikatsioon. RC mudelis Mhr1p vahendab replikatsiooni initsiatsiooni tootmaks konkatemeere. Rohelisega näidatud raja tulemuseks on Holliday vaheühendid. Seejärel kantakse konkatemeerid tütarakkudesse ja moodustuvad ühesuured mtDNA rõngad. (b) Replikatsioonimudelid detailsemalt – 5'-dsExo tekitab üleulatuvad 3'-otsad. Kui Mhr1p paardub ainult ühe 3'-ssDNA sabaga, algab RC

replikatsioon. Kui Mhr1p paardub mõlema 3'-ssDNA sabaga on tulemuseks Holliday vaheühendid. Viimasel juhul tuleb mängu Cce1p, mille abil tekivad CO produktid (tsirkulaarsed mtDNA multimeerid). Joonis on kohandatud eestikeelseks Solieri 2010. aasta artikli põhjal.

### 1.5 Mitokondriaalse DNA reparatsioon

Mitokondris on parandusmehhanismideks homoloogiline rekombinatsioon (HR – *homologous recombination*), BER (*base excision repair*, lämmastikaluste väljalõige), NER (*nucleotide excision repair*, nukleotiidide väljalõige), valepaardumiste parandamine (MMR – *mismatch repair*) ning NHEJ (*non-homologous end joining*, mittehomoogne DNA otste ühendamine) (ülevaade Svilar *et al.*, 2011; Kalifa *et al.*, 2012). BERi, NERi ja MMRi puhul kõrvaldatakse kahjustused väljalõikega ning HRi ja NHEJi puhul toimub rekombinatsioonisõltuv reparatsioon.

HR ja NHEJ on vajalikud kaheaahelaliste katkete (DSB) parandamiseks (Alexeyev *et al.*, 2013). HR on konserveerunud kõigis kolmes elu domeenis ning on olemas ka viirustes. HRi puhul toimub DNA vahetus peaaegu täiuslikult homoloogiliste paarisaja aluspaariga järjestuste vahel (Symington, 2002). HRi molekulaarsete mehhanismide seletamiseks on välja käidud palju eri mudeleid, millest populaarseimad on DSBR (*double-strand break repair*) (Szostak *et al.*, 1983) ja SDSA (*synthesis-dependent strand-annealing*). Vaata joonis 5. Mõlemas mudelis algab rekombinatsioon 3' üheaahelaliste sabade loomisega (Symington, 2002). DSBR'is toimub seejärel 3'-otste sissetung homoloogsesse dupleksisse, pärast ligeerimist moodustub topelt-Holliday-ühendus ning tulemuseks on võrdses koguses ristunud (*crossover*) ja ristumataprodukte (Szostak *et al.*, 1983). SDSA'is toimub ühe 3' saba sissetung homoloogsesse dupleksisse, algab DNA süntees, uus ahel paardub teise 3' otsaga ja DNA süntees lõpetab parandamise (Symington, 2002).



**Joonis 5. HR mudelid.** a) Kaheaahelalise katke parandamine algab mõlemal mudelil 3' üleulatuvate otste loomisega, seejärel toimub ahela invasioon ja DNA süntees, moodustub D-silmus. b) DSBR'i puhul moodustub kahe Holliday ühendusega vaheühend, mis pärast sünteesi ja ligeerimist katkeb Holliday ühenduste kohalt, moodustades võrdses koguses ristunud ja ristumataprodukte. c) SDSA korral toimub ahela asendus ja seondumine (*annealing*). Teisele ahelale jääv tühik täidetakse sünteesi ja ligeerimise teel. Joonis on kohandatud eestikeelseks Sung'i ja Klein'i 2006. aasta artikli põhjal.

BERi peetakse üheks lihtsamaks parandusrajaks ja see on kasutusel lihtsamate, aluspaari tasandil kahjustuste korral (Baute ja Depicker, 2008). BER rada koosneb neljast põhisammust: aluspaari kahjustuse ära tundmine ja selle eemaldamine; DNA otsa töötlemine; tühiku täitmine ja viimaks ligeerimine (Kaniak-Golik ja Skoneczna, 2015). Ka NER ja MMR



on sarnase tööpõhimõttega, aga parandus toimub nukleotiidide tasemel. Erinevuseks on kasutatavad ensüümid – BER'is on kasutusel DNA glükosülaasid (Svilar *et al.*, 2011). MMR-is osalevad MSH- (Msh2-Msh6) ja MLH-valgud (Mlh1-Pms1) (Alexeyev *et al.*, 2013).

## 1.6 *Saccharomyces cerevisiae* mudelorganismina

Mudelorganismi valikul lähtutakse kolmest aspektist: mudelorganismiga töötamine peab olema eetiline ja eksperimentaalselt mugav; mudelorganism varustab teadlasi raamistikuga, mille abil optimeerida meetodeid ning mudelorganism peab esindama suuremat klassi uuritava fenomeniga elusolendeid (Karathia *et al.*, 2011). *Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärm on laborites laialdaselt kasutatav mudelorganism, sest tegemist on eukarüootse ainuraksega, kes suudab kasvada erinevates keskkonnatingimustes ja talub manipulatsioone (Drubin, 1989).

Ainuraksus on hea omadus, sest nii on organism väike, lühikese generatsiooniajaga (pärmil 1,25-2 tundi) ja mugav laboris kasvatada (Karathia *et al.*, 2011). Tänu pärmi eukarüootsusele ja sarnasele rakustruktuurile saab uurimuste tulemusi laiendada teistele päristuumsetele organismidele (k.a. inimene), samas pole pärmis nii palju mittekodeerivat DNAd kui teistes eukarüootides (Botstein ja Fink, 1988). *S. cerevisiae* genoom (ka mtDNA genoom) on täielikult sekveneeritud (Goffeau *et al.*, 1996), andes võimaluse iga katse tulemus siduda geneetilise infoga ning leida analoogiaid inimese genoomiga. Pagaripärm kuulub *petite*-positiivsete pärmi hulka ja seega suudab taluda mtDNA deletsioone (Hyman *et al.*, 1982). Pagaripärm on eetiliselt ja eksperimentaalselt mugav: temaga on ohutu, lihtne ja odav töötada, sest ta ei tooda toksiine, on laialdaselt kättesaadav ning katsemeetodid on korralikult välja töötatud.

Tänu neile omadustele on pagaripärmi kasutatud raku bioloogia, rakutsükli, raku metabolismi ja signaali ülekande uurimiseks (Petranovic *et al.*, 2010). Paljud regulaatorsed rajad pärmis ja inimeses on konserveerunud, seetõttu saab pärmi abil uurida (enneaegset) vananemist ja mitmeid neurodegeneratiivseid haiguseid (Karathia *et al.*, 2011). mtDNA mutatsioonid põhjustavad inimesel näiteks Leberi päritavat optilist neuropaatiat, Pearsoni luuüdi-pankrease sündroomi, Kearns-Sayre'i sündroomi (südamelihaste, silmade ja skeetilihaste liigutamise funktsiooni kadumine), Leigh sündroomi (progresseeruv entsefalopaatia, dementsus, hingamisraskused), Alpersi sündroomi (maksa rasvväärastus) ja pärilikku kardiomiopaatia (Park ja Larsson, 2011). mtDNA replikatsiooni ja parandamise eest vastutab inimeses



polümeraas  $\gamma$ , mille ortoloogi kodeerijaks pärmis on MIP1 (Stumpf *et al.*, 2010). MIP1 mutante on kasutatud, et uurida neurodegeneratiivseid haigusi tehes Mip1 samad mutatsioonid, mis inimeses haigusi põhjustavad (Stumpf *et al.*, 2010).

### 1.7 mtDNA stabiilsust mõjutavad valgud

Pärmi mtDNA sisaldab mitmeid valke, mis on seotud DNA replikatsiooni, transkriptsiooni, parandamise, säilitamise, pakkimise ja segregatsiooniga (Hermann ja Shaw, 1998). Üle 30 valgu seostatakse mtDNA säilitamisega (vt. Tabel 1) (Foury, 1989). Nende valkude mutatsioonid pole pagaripärmile letaalsed, kuid vähendavad mtDNA hulka (Chen *et al.*, 1993). Mõned pärmi valkudest on konserveerunud inimeseni, näiteks DNA helikaas Pif1 (Foury ja Lahaye, 1987), aga inimeses on ka ainulaadseid mitokondriaalseid valke, näiteks replikatiivne DNA helikaas Twinkle (Jemt *et al.*, 2011). mtDNA säilitamine hõlmab endas mitokondriaalse nukleoidi mtDNA koopiate replikatsiooni, parandamist, pakkimist (*assembly*), segregatsiooni ja jagamist (*partitioning*) (Meeusen *et al.*, 1999). Tabelis 1 toodud valkudest on mtDNA replikatsiooniga otseselt seotud Mip1 ja Rim1. mtDNA transkriptsioonis osalevad Rpo41 ja Mtf1. mtDNA rekombinatsiooni ja parandamisega on seotud valgud Mgm101, Mhr1 ja Msh1. Valgud Aco1 ja Ilv5 on võimelised asendama Abf2-te, millest viimane pole vajalik  $\rho^+$  genoomi säilitamiseks (Kaniak-Golik ja Skoneczna, 2015).

**Tabel 1. Pärmi mtDNA säilitamisega seostatud valgud ning nende ülesanded rakus.**

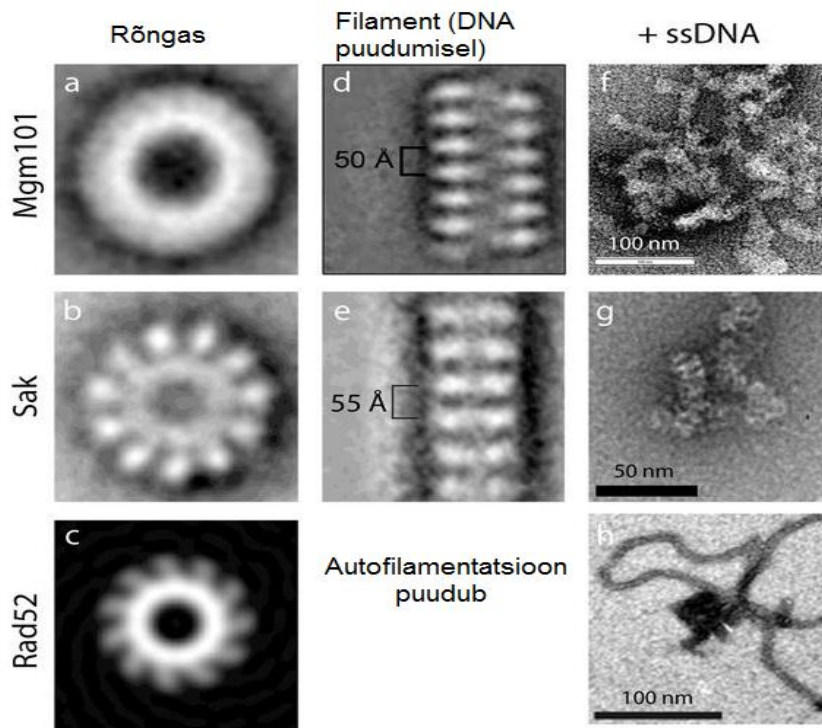
Valk	Ülesanne	Allikas
Abf2 ( <i>ARS-binding factor 2</i> )	DNA sidumine ja pakkimine	(Diffley ja Stillman, 1991)
Aco1 ( <i>mitochondrial aconitase</i> )	akonitaas/mtDNA säilitamine	(Chen <i>et al.</i> , 2005)
Cce1 ( <i>cruciform cutting endonuclease</i> )	resolvaas	(Kleff <i>et al.</i> , 1992)
Cdc9 ( <i>Cell division cycle protein</i> )	ligaas	(Willer <i>et al.</i> , 1999)
Exo5 ( <i>exonuclease 5</i> )	ssDNA 5'-eksonukleas	(Burgers <i>et al.</i> , 2010)

Hmi1 ( <i>Helicase in mitochondria 1</i> )	3'-5'-DNA helikaas	(Sedman <i>et al.</i> , 2000)
Hsp60 ( <i>Heatshock protein 60</i> )	mt nukleoidide segregatsioon	(Kaufman <i>et al.</i> , 2000)
Ilv5 ( <i>Isoleucine-plus-Valine requiring protein</i> )	aminohapete biosüntees/ mtDNA stabiilsus	(Macierzanka <i>et al.</i> , 2008)
Irc3 ( <i>Increased recombination centers</i> )	DNA helikaas	(Sedman <i>et al.</i> , 2014)
Mgm101 ( <i>Mitochondrial genome maintenance protein 101</i> )	DNA sidumine, parandamine, paljundamine	(Chen <i>et al.</i> , 1993)
Mhr1 ( <i>Mitochondrial homologous recombination protein 1</i> )	rekombinaas, mtDNA parandamine	(Ling <i>et al.</i> , 1995)
Mmm1 ( <i>Maintenance of Mitochondrial Morphology</i> )	mtDNA replikatsiooni ja kasvu kontroll	(Hobbs <i>et al.</i> , 2001)
Mip1 ( <i>Macrophage inflammatory protein 1</i> )	mtDNA polümeraas	(Foury, 1989)
Msh1 ( <i>mismatch repair protein 1</i> )	mismatch-parandus	(Chi ja Kolodner, 1994)
Mtf1 ( <i>Metal regulatory transcription factor 1</i> )	Rpo41 spetsiifiline faktor/sigma faktor	(Lisowsky ja Michaelis, 1989)
Pif1 ( <i>Petite integration frequency protein 1</i> )	5'-3'-DNA helikaas	(Foury ja Lahaye, 1987)
Rim1 ( <i>Replication in mitochondria 1</i> )	ssDNAd siduv valk	(Van Dyck <i>et al.</i> , 1992)
Rpo41 ( <i>RNA polümeraas 41</i> )	RNA polümeraas	(Wilcoxon <i>et al.</i> , 1988)

## 1.8 Valk Mgm101

Geen MGM101 kodeerib positiivselt laetud valku Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*), mis koosneb 269 aminohapetest ja kaalub 30 kDa (Chen *et al.*, 1993). Valk Mgm101 on vajalik mtDNA säilitamiseks, sest tuumageeni MGM101 häiringud viivad wt mtDNA kaotuseni (Chen *et al.*, 1993). Mgm101 seostub mitokondriaalse nukleoidiga (valk-DNA kompleksiga), taoliselt seostuvaid Mgm101 homolooge (nt. Glom2 hallituses *Physarum polycephalum*) on leitud teistestki eukariootsetest organismidest (Itoh *et al.*, 2011). Fenotüüpiline analüüs näitas, et Mgm101 on vajalik oksüdatiivselt kahjustatud mtDNA parandamisel – Mgm101 mutandid on tundlikud H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-le ning UV-ja gammakiirgusele (Meeusen *et al.*, 1999). Mgm101 surub alla mtDNA fragmenteerumist ja osaleb homoloogilise rekombinatsiooni mehhanismis, mis parandab kahjustunud mtDNA-d (Mbantenkhu *et al.*, 2011). Katsed *Candida parapsilosis*'ga näitasid, et lisaks rollile lineaarse mtDNA rekombinatsioonisõltuvas replikatsioonis, võib Mgm101 olla oluline mitokondriaalsete telomeeride säilitamisel (Pevala *et al.*, 2016).

Mgm101 on Rad52-tüüpi SSAP (*single-stranded annealing protein*), mis moodustab suuri (~400kDa ja 200Å) oligomeerseid rõngaid (vt. Joonis 6) (Mbantenkhu *et al.*, 2011). Rad52-tüüpi valgud omavad suurt rolli DSB-de parandamisel (vt. Joonis 3) (Symington, 2002). Rad52-tüüpi valke leidub paljudes eri organismides (nt. bakteriofaagides, bakterites, inimeses) ja need osalevad rekombinatsiooni protsessides (Symington, 2002). Mgm101 ongi struktuurilt sarnasem bakteriofaagi homoloogidele (nt. Redβ, Erf, RecT, Sak) kui eukariootse raku Rad52-le, sest ei sisalda pikendatud C-terminust ja moodustab homooligomeerseid rõngaid (Nardozi *et al.*, 2012). DNA puudumisel moodustab Mgm101 kokkupressitud helikaasseid filamente, ka see tunnus pole Rad52-le omane (Mbantenkhu *et al.*, 2011). Oligomeersed rõngad peavad säilitama oma struktuuri tagamaks Mgm101 funktsioone *in vivo* (Nardozi *et al.*, 2012). Mgm101 sisaldab viit tsüsteiini (Cys): Cys-181, Cys-208, Cys-240, Cys-216 ja Cys-217, millest viimased kaks on üliolulised mtDNA säilitamiseks *in vivo* (Nardozi *et al.*, 2012). Mgm101 seondub eelistatult ssDNA-le, kusjuures erinevalt Rad52-st, on ssDNA-le seondumine suurem C-terminuses, mitte SSA-I (Mbantenkhu *et al.*, 2013). Lisaks on C-terminaalne ots (*tail*) vajalik valgurõngaste stabiilseerimiseks *in vitro* ja valgu enda stabiilsuseks *in vivo* (Mbantenkhu *et al.*, 2013).



**Joonis 6. Valgu Mgm101, Sak ja Rad52 SSA domeeni kõrgema järgu struktuurid transmissioon-elektronmikroskoobis.** Sak (Snf1 aktiveeriv kinaas) ja Rad52 rõngad koosnevad 11 alaühikust, aga Mgm101 omad 14 alaühikust. Ainult Sak ja Mgm101 moodustavad kokkusurutud filamente DNA puudumisel. Ka ssDNA olemaslolul käituvad sarnasemalt Sak ja Mgm101 moodustades lühendatud komplekse, aga Rad52-st tekivad pikad-peened filamendid (Chen, 2013). Joonis on kohandatud eestikeelseks Chen'i 2013. a ülevaate artikli põhjal.

MGM101 on vajalik pagaripärmi wt rakkude ja  $Np^-$  hingamismutantide mtDNA säilitamiseks, aga pole vajalik HSp<sup>-</sup> mutantidele, sest need sisaldavad amplifitseeritud *ori/rep*-järjestust (Zuo *et al.*, 2002). Seega on võimalik, et *ori/rep*-järjestused osalevad alternatiivse replikatsiooni initsiatsiooni protsessis või moodustavad struktuure, mis valmistavad ette (*prime*) DNA sünteesi või kasutavad primaasi replikatsiooni initsiatsiooniks (Zuo *et al.*, 2002). Samas *ori/rep*-järjestused ei pruugi mängida olulist rolli wt rakkudes (Chen *et al.*, 1993). *Petite*-negatiivsele pärmile, *Kluyveromyces lactis*'ele on geeni MGM101 häired letaalsed, sest kaob mtDNA ja *petite*-negatiivne pärm ei saa selleta hakkama (Clark-Walker ja Chen, 1996).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida valgu Mgm101 deletsiooni mõju mtDNA stabiilsusele erinevates HSp<sup>-</sup> tüvedes.

Selleks oli tarvis:

- deleteerida Mgm101 valk erinevatest HSp<sup>-</sup> tüvedest
- kontrolliks deleteerida Ste5 valk samadest HSp<sup>-</sup> tüvedest
- puhastada DNA
- kanda DNA nailonfiltrile (*Southern blot*) ja detekteerida radioaktiivselt märgistatud proovidega nii nukleaarne kui ka mitokondriaalne DNA

### 2.2. Materjal ja meetoodika

#### 2.2.1. Kasutatud plasmiidid, pärmitüved ja söötmed

Mgm101 geeni deleteerimiseks vajaliku hph (hügromütsiin B) resistentsusgeeni sisaldava PCR produkti saamiseks kasutati plasmidi pFA6a HphMX6 (*Euroscarf*).

HSp<sup>-</sup> tüved olid tehtud Tiina Sedmani ja Karin Villemsoni poolt W303 MATa tüvest (Thomas ja Rothstein, 1989).

**Tabel 2. Kasutatud *Saccharomyces cerevisiae* tüved**

Tüve nimi	Iseloomustus	Valmistaja
W303 MATa Hsa11 (HS- hüpersupressiivne) *edaspidi A11	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori3, mtDNA fragmendi suurus on 1790bp, vt. järjestust Lisa 1	Tiina Sedman
W303 MATa Hsa11 mgm101::HphMX6	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, mgm101::HphMX6</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori3, mtDNA fragmendi suurus on 1790bp, MGM101 geen asendatud Hph antibiootikumi resistentsusgeeniga	Tiina Sedman

W303 MATa Hsa11 ste5::HphMX6	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, ste5::HphMX6</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori3, mtDNA fragmendi suurus on 1790bp, STE5 geen asendatud Hph antibiootikumi resistentsusgeeniga	Töö autor
W303 Hsa1184 *edaspidi A1184	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, , ste5::HphMX6</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori2 ning ori7 B ja A plokki, mtDNA fragmendi suurus on 1184bp, vt- järjestust Lisa 2	Karin Villemson
W303 Hsa1184 mgm101::HphMX6	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, mgm101::HphMX6</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori2 ning ori7 B ja A plokki, mtDNA fragmendi suurus on 1184bp	Töö autor
W303 Hsa1184 ste5::HphMX6	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, ste5::HphMX6</i> Haploid, HSp <sup>-</sup> , sisaldab ori2 ning ori7 B ja A plokki, mtDNA fragmendi suurus on 1184bp	Töö autor

Kasutati söödet YPD: 1% pärmiekstrakt, 2% baktotrüpton, 2% glükoos (vedelsööde); tardsöötme korral lisati vedelsöötmele 1,7% agarit.

Tardsöötmetassidele lisati vajadusel antibiootikumi hph-d (hügromütsiin B) (kontsentratsiooniga 0,3mg/ml). Pärimüvesid kasvatati 25°C või 30°C juures.

## 2.2.2. Kasutatud praimerid ja PCR reaktsioonid

Tabelis 3 on esitatud loetelu katsetes kasutatud praimeritest. Iga praimeri kohta on toodud nimi, 5'->3'-suunaline järjestus, iseloomustus ja eesmärk, milleks seda katsetes kasutati.

**Tabel 3. Kasutatud praimerid**

Praimeri nimetus	5'->3' järjestus	Iseloomustus	Eesmärk
Mgm101 hph 3'	ATT GGA ATA TAT ATA CTT ACT AAA ATT AGC TTA TAT GGT TCG CAT ATT <u>GAA TCG ATG AAT</u> <u>TCG AGC TCG</u>	Praimer seondub plasmiidile pFA6a HphMX6 (vastassuunaline). Praimer sisaldab plasmiidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).	HphMX6 kasseti amplifikatsioon Mgm101 lookusesse integratsiooniks
Mgm101 hph 5'	GGT AGA GAC TAA AAA AGG AAA GAA AGG ACA AGT AGG AAG ATC AGC GTA <u>CGA TTA AGG CGC</u> <u>GCC AGA TCT</u>	Praimer seondub plasmiidile pFA6a HphMX6 (pärisuunaline). Praimer sisaldab plasmiidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).	HphMX6 kasseti amplifikatsioon Mgm101 lookusesse integratsiooniks
Mgm101 5up	GGA TTC GAG TGA GTA GTT	Praimer on komplementaarne 190 nt MGM101 ORF-st ülesvoolu paikneva järjestusega (pärisuunaline).	Mgm101 lookuse kontroll
Mgm101 3down	ATC GGT GAA CAA GGT AAG	Praimer on komplementaarne 102 nt MGM101 ORF-ist allavoolu paikneva järjestusega (vastassuunaline).	Mgm101 lookuse kontroll

Ste5 KANMX4N	CTA AAA AAG GAA GAT ACA GGA TAC AGC GGA AAC AAC <u>TTA TAA ATG CGT</u> <u>ACG CTG CAG GTC</u> <u>GAC</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala STE5 ORF-st ülesvoolu paikneva järjestusega (pärisuunaline). Praimer sisaldab plasmiidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).	HphMX6 kasseti amplifikatsioon Ste5 lookusesse integratsiooniks
Ste5 KANMX4C	GGG ATG CTT TCT TTT TAT TAT TGC ATA AAA TTT AGT GTA TAC <u>TCTAGA</u> <u>ATT CGA GCT CGT</u> <u>TTT CGA CAC</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala STE5 ORF-ist allavoolu paikneva järjestusega (vastassuunaline). Praimer sisaldab plasmiidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).	HphMX6 kasseti amplifikatsioon Ste5 lookusesse integratsiooniks
Ste5 prom	TAT TTC GAG TGA AGA AGA AGC GTT AAA	Praimer seondub STE5 promootorile (pärisuunaline).	Ste5 lookuse kontroll
Ste5 term	ATG AAC TTG AAA GAC TAA GAA GAA	Praimer seondub STE5 promootorile (vastassuunaline).	Ste5 lookuse kontroll
pFa6a_check forw	CTC GAC ATC TGC CCA GAT	Praimer seondub hph resistentsusgeenile (pärisuunaline).	Insertatsiooni kontroll
Rev Hph5 out	ACA TGG GGA TGT ATG GGC TA	Praimer seondub hph resistentsusgeenile (vastassuunaline).	Insertatsiooni kontroll
ORI5 in	GGG GGT CCC AAT TAT TAT TTT C	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> järjestusele (pärisuunaline).	Mitokondriaalse radioaktiivse proovi süntees



ORI3 in	TAG GGG GAG GGG GTG GGT	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> järjestusele (vastassuunaline).	Mitokondriaalse radioaktiivse proovi süntees
DNA 3834	CCG AAT TCG CTA AAA TTG GTA TCT CCG TA	Praimer seondub DNA2 geenile (pärisuunaline).	Nukleaarse radioaktiivse proovi süntees
DNR 4193	CCG GAT CCT ATT GCT TCT TTT TGA TTC AA	Praimer seondub DNA2 geenile (vastassuunaline).	Nukleaarse radioaktiivse proovi süntees

Tabelis 4 on esitatud katsetes kasutatud PCR reaktsioonid. PCR reaktsioon koosneb neljast etapist: DNA esmane denaturatsioon, DNA denaturatsioon, praimerite seondumine ja DNA süntees. Etappe 2-4 korratakse, et saada soovitud hulgal PCR produkti.

**Tabel 4. Kasutatud PCR reaktsioonid**

<b>Kasutus/ Protsess</b>	Mgm101 ja Ste5 deletsiooniks vaja mineva antibiootikumi- kasseti valmistamine	<i>mgm101Δ</i> ja <i>ste5Δ</i> deletsioonitüvede kontroll	Nukleaarse ja mitokondriaalse radioaktiivse proovi valmistamine	<i>ste5Δ</i> deletsioonitüve kontroll
1. DNA denaturatsioon	95°C, 5 min	95°C, 3 min	95°C, 3 min	95°C, 3 min
2. DNA denaturatsioon	95°C, 30 sek	95°C, 30 sek	95°C, 30 sek	95°C, 30sek
3. Praimerite seondumine	53°C, 30sek	53°C, 30sek	54°C, 30sek	54°C, 30sek
4. DNA süntees	72°C, 2 min	72°C, 2 min 10s	72°C, 30 sek	72°C, 3 min 30s
Tsükli (2.-4.) kordusi	30	30	16	30

Kasutati järgnevaid PCR reaktsioonisegusid:

- MGM101 ja STE5 geenide deleteerimiseks vajaliku antibiootikumikassetti sisaldava fragmendi valmistamine: 30µl reaktsioonisegus sisaldusid PCR puhver(75mM Tris-HCl pH=8,8; 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; valmistajaks Maie Loorits), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP (desoksünukleotiidid), 100ng pFA6a Hph plasmidi, 10 pmol kumbagi praimerit (päri- ja vastassuunaline, Mgm101 hph 3' ja Mgm101 hph 5' või STE5 KANMX4N ja STE5 KANMX4C), 2,5U Pfu/Taq ensüümi (4:1 Pfu/Taq, valmistajaks Maie Loorits), lõpliku mahuni milli-Q (mQ) vett
- MGM101 ja STE5 geenide deletsiooni kontroll: 10µl reaktsioonisegu sisaldas PCR *yellow* puhvrit (75mM Tris-HCl pH=8,8; 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Triton X-100; 0,5% Ficoll400; 1mM Tartazine; valmistajaks Maie Loorits), 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTP, 10 pmol kumbagi praimerit (päri- ja vastassuunaline, Mgm101 up ja Mgm101 down või Ste5 prom ja Ste5 term; Mgm101 3'down või Ste5 term ja pFA6a check forw; Mgm101 5'up või Ste5 prom ja hph rev 5 out), 3-5µl eraldatud DNA-d (vt. 2.2.5. DNA eraldus liitiumatsetaat meetodil (Lööke *et al.*, 2011)), 5U Taq ensüümi (valmistajaks Maie Loorits), lõpliku mahuni mQ vett
- Radioaktiivne proov: 20µl reaktsioonisegu sisaldas: 25ng eelnevalt PCR-ga amplifitseeritud DNAd (DNA2 proov oli tehtud w303 genoomselt DNAlt ning ori2 proov mtDNAlt), 10pmol kumbagi praimerit (DNA3834 ja DNR419 või ORI5 in ja ORI3 in oligod), 0,2mM -C dNTP, PCR puhvrit, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 5U Taq ensüümi, 2µl γ-<sup>32</sup>P-ATP (150µCi) (*Hartman Analytic*), lõpliku mahuni mQ vett

PCR reaktsioonides kasutati *Eppendorf Mastercycler Personal* või *Biometra Thermocycler T1* PCR masinaid.

### 2.2.3. PCR produktide puhastamine

PCR-ga saadud DNA puhastati kasutades fenoolkloroformi ekstraktiooni ja etanooliga sadestamist. Jälgiti Russelli ja Sambrooki (2001) välja töötatud protokoll. Proovi maht viidi 200µl-ni lisades T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (pH=7,5). Seejärel lisati 4µl (20µg/µl, molekulmass: 110000) dekstraani ja 80µl fenoolkloroformi (pH=7,5). Segule tehti 2x30 sekundit vorteks, lastes proovil vahepeal 1 minut seista. Seejärel segu tsentrifuugiti 5 minutit kiirusel 13 400 rpm (siin ja edaspidi Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifuug, rootor F-45-12-11, kui pole märgitud

teisiti). Ülemine faas (180µl) kanti uude tuubi, sellele lisati 18µl (1/10) 3M NaOAc (naatriumatsetaat, pH=7,0) ja 500µl (2,5 mahtu) 96% EtOH (etanooli). Proovile tehti vorteks ja jäeti -20°C juurde sadenema minimaalselt 15 minutiks. Seejärel tsentrifuugiti segu 5 minutit kiirusel 13 400 rpm. Sademelt eemaldati supernatant ja sade pesti 100µl-ga 80% EtOH-is hoides seda laual paar minutit. Proov tsentrifuugiti 5 minutit kiirusel 13 400 rpm. Sademelt eemaldati supernatant. Transformatsiooni proovi sademele lisati 30µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> ja radioaktiivse proovi omale 100µl TEN-i (10mM Tris; 1mM EDTA; 100mM NaCl). Tehti vorteks ja jäeti 4°C peale lahustuma ning seejärel säilitati -20°C juures.

#### **2.2.4. *Saccharomyces cerevisiae* tüvede tegemine kasutades liitiumatsetaadi transformatsiooni protokoll**

Pärmitüved A11 ja A1184 külvati YPD tassidele ja kasvatati 3-4 päeva 30°C juures. Tassilt võeti rakke, mida kasvatati 40ml YPD vedelsöötmes 25-30°C juures loksutil (pöördeid 180/min) tiheduseni 0,4-0,5 (tihedus mõõdetud OD lainepikkusel 600nm, nullimiseks kasutati YPD söödet). Rakulahust tsentrifuugiti 3 minutit 3200rpm („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617 Swing-out), sööde valati pealt ära, rakud pesti 5ml steriilse mQ veega. Tsentrifuugiti uuesti ja valati vesi ära. Katses kasutati steriilseid vahendeid. Rakud suspendeeriti üles 1ml 0,1M LiOAc/T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s ja kanti üle 1,5ml tuubi. Tsentrifuugiti 1 minut 4000rpm ja eemaldati supernatant. Rakusade suspendeeriti 50µl 0,1M LiOAc/T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s ja inkubeeriti 20 minutit 30°C juures aeg-ajalt raputades.

Proovile lisati 4µl (~1µg) PCR produkti (sisaldab hph resistentsusgeeni ja STE5 või MGM101 geenide piirkonnaga homoloogset järjestust) ja 20µl (100ng) ettevalmistatud *carrier*-DNA-d (*Amresco DNA Sodium Salt, Herring Sperm*; seda kuumutati 5 minutit 95°C juures ja jahutati 5 minutit jääl). Segule tehti õrn vorteks ja inkubeeriti 20 minutit 30°C juures. Lisati 300µl 40% PEG (molekulmassiga 4000)- 0,1M LiOAc/T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> ja tehti vorteks. Proovi inkubeeriti 30 minutit 30°C juures. Lisati 35µl 100% DMSO-d ja tehti vorteks. Seejärel tehti rakkudele kuumašokk: 10 minutit 42°C. Rakud tsentrifuugiti 1minut 4000rpm põhja ja supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti üles 0,5ml YPD-s ja kanti üle 2ml-i YPD-d sisaldavatesse katseklaasidesse. Proovid pandi loksutisse 30°C peale 180 pööret/min 10 tunniks kasvama.

Hommikul tsentrifuugiti rakud põhja (1 minut, 4000rpm). Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 50µl-is YPD-s. Saadud segu kanti pipeti ja spaatli abil YPD-hph tassidele. Tasse inkubeeriti 30°C peal kolm päeva. Seejärel külvati 6 kolooniat uuele YPD-hph tassile ja

kasvatati taas kolm päeva 30°C juures. Seejärel tehti kasvanud kolooniate rakkudest 25% glütseroolis säilituskultuurid.

#### **2.2.5. DNA eraldus liitiumatsetaat meetodil (Lööke *et al.*, 2011)**

YPD tassidel kasvatati A11 ja A1184 tüve 3 päeva 30°C juures. Tassidelt võeti 2 kolooniat 1,5ml tuubidesse, milles oli 100µl 200mM LiOAc, 1% SDS lahus. Inkubeeriti 70°C juures 10 minutit. Lisati 300µl 96% EtOH-i, tehti vorteks ja lasti 2 min toatemperatuuril seista. Tehti tsentrifuugimine 3 min 13 400rpm. Supernatant eemaldati ja sade pesti 500µl 70% EtOH-ga. Sade kuivatati 37°C juures avatud kaanega. Seejärel sade lahustati T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-s (10mM Tris-HCl pH=7,5; 0,1mM EDTA pH=8,0), tsentrifuugiti 1min 13400rpm ja sellest kasutati 1-3µl PCR reaktsioonideks.

#### **2.2.6. Pärmigeenoomse DNA eraldus**

Rakud kasvatati 30°C juures YPD tassidel, millele deletsiooniga tüvede korral oli lisatud antibiootikumi hph (hügromütsiin B). Tassidelt võeti 1-3 kolooniat ja pandi kasvama 3ml YPD vedelsöötmes 30°C juurde. Kultuur kasvatati tiheduseni 0.8 (~6h). Rakkude tihedust mõõdeti OD<sub>600</sub> juures. Seejärel rakud tsentrifuugiti põhja pööretel 4000rpm 5 minutit („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617 Swing-out). Sööde valati pealt ja rakud resuspendeeriti 1ml mQ vees. Lahus viidi üle eelkaalutud 1,5ml tuubidesse. Tuube tsentrifuugiti 1 min 13400 rpm-i ja eemaldati vedelik. Rakud kaaluti ja arvutati rakkude lüüsimiseks vajamineva ensüümi Zymolase 20T (*Nacalai Tesque*) kogused (4mg ensüümi 1g rakkude kohta). Rakud suspendeeriti 0,5ml sorbitooli (1M sorbitool; 10mM Tris pH 8; 10mM EDTA) lahuses ja lisati välja arvatud ensüümi kogused. Tehti õrn vorteks, seejärel inkubeeriti rakke 37°C juures 30 minutit, aeg-ajalt segades. Segu tsentrifuugiti 1min 13400rpm ja supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti 0,5ml 50mM Tris (pH=7,5)/20mM EDTA lahuses. Lisati 50µl 10% SDS-i, segati õrnalt. Segu inkubeeriti 65°C juures 30 minutit, seejärel jahutati jääl 5 minutit. Lisati 200µl 5M K-atsetaati, segati ja hoiti jääl 40 minutit. Tsentrifuugiti 5min 14000rpm („Hettich“ Mikro 200R tsentrifuug, rootor 2424) 4°C juures. Supernatant viidi üle uude tuubi ja lisati supernatandile 0,6 mahtu isopropanooli. Lasti 5 minutit toatemperatuuril seista. Tsentrifuugiti 1 min 13400rpm ja supernatant eemaldati. Sademele lisati 100µl 80% etanooli, lasti 5 minutit toatemperatuuril seista. Korrati

tsentrifuugimist ja supernatandi eemaldamist. Sade lahustati õrnalt segades 100µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>RNAasA-s (10 mM Tris pH=7; 1 mM EDTA pH=8; 20 µg/ml RNAasA). Segu inkubeeriti 65°C peal 15 minutit. Lisati võrdses mahus 2x proteinaasK puhvrit (1% SDS; 10 mM Tris pH=7; 10 mM EDTA pH=8,0) ja 20µg ProteinaasK ensüümi (*Thermo Scientific*). Segu inkubeeriti 55°C juures 30 minutit. Lisati 80µl fenoolkloroformi (pH=7.5), segati ja lasti laual seista 15 minutit. Segu tsentrifuugiti 1min 13400rpm ja ülemine faas kanti uude tuubi. Lisati 1/10 mahtu 3M Na-atsetaati (pH=7) ja 2,5 mahtu 96% etanooli. Tehti vorteks ja hoiti temperatuuril -20°C 15 minutit. Tsentrifugiti 1min 13400rpm ja eemaldati supernatant. Sademele lisati 100µl 80% etanooli ja lasti paar minutit seista. Korrati tsentrifuugimist ja supernatandi eemaldamist. Lisati 30µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> ning jäeti -4°C peale lahustuma. DNA-d säilitati -20°C juures.

### 2.2.7. DNA restriksioon

Restriksioon tehti 30µl-is reaktsioonisegus (sisaldas ~ 0,5 µg DNA-d, restriктаasile vastavat puhvrit ja 5U restriктаasi) ja viidi läbi vastavalt *Thermo Scientific* protokollile. Restriksioon toimus 37°C juures kaks tundi. A11 tüvest eraldatud DNA-sid lõigati restriктаasiga XbaI ja A1184 tüvest eraldatud DNA-sid DraI-ga.

### 2.2.8. Agaroosgeelelektroforees ja DNA kandmine nailonfiltrile (*Southern blot*)

Valmistati 0,7% TAE agaroosgeel (2,1g agaroosi, 1xTAE-d 300ml-ni), 9µl etiidiumbromiidi (EtBr) (3ng/ml) ja puhver (16ml 50xTAE, 24µl EtBr, 800ml-ni mQ vett). Restrikteeritud DNA proovidele lisati 6µl proovipuhvrit 6xTAE (10mM Tris (pH=7.5)), 5mM EDTA, 0,25% BFB (broomfenool sinine), 50% glütserool) ja kanti 33µl proovi geelile. Geel voolutati 3V/cm kohta toatemperatuuril. Valmis geelist tehti pilt Uvitec Uvipro Gold masinaga ja geel lõigati väiksemaks eemaldades kohad, kus puudus DNA. Geelile pandi peale aluseline puhver (0,4M NaOH; 0,6M NaCl) (*AppliChem* protokoll) ja asetati loksutile 10 minutiks.

Valmistati ette *Southern Blot* komponendid (plastvann, klaasplaat, 3M *Whatman* filterpaber, nailonfilter (*AppliChem*, *ReprobeNylon Positively Charged Transfer membrane* 0,45µm), paberrätikud, parafilmiribad). Enne kasutamist tehti 3M *Whatman* filterpaberid ja nailonfilter märjaks eelpool kirjeldatud aluselises puhvris. Raskuseks asetati veenõu ja ülekanne toimus üleöö. Järgmisel hommikul neutraliseeriti filter neutraliseerimispuhvris (1M Tris; 1,5M NaCl)

2x10 minutit toatemperatuuril. Vaata ka joonis 7.



**Joonis 7. Southern Blot.** Üle plastvanni asetati klaasplaat, millele pandi sild (puhvril märjatud 3M *Whatman* filterpaberid). Sillale pandi geel ja geeli peale nailonfilter. Filtrile asetati märjatud 3M *Whatman* filterpaber ja äärtesse pandi parafilmiribad. Õhumullide eemaldamiseks rulliti igas etapis *blotti* klaaspiptiga. Peale laoti paberkäterätid ning raskuseks asetati klaasplaat ja veenõu.

#### 2.2.9. Radioaktiivsete proovide valmistamine ja hübridatsioon

PCRi proov valmistati PCR-i reaktsiooniga. Nukelaarsel proovil olid praimeriteks DNA3834 ja DNR4193, amplifitseeritavaks 359nt fragment DNA2 geenist ning mitokondriaalsel proovil olid praimeriteks ORI3 in ja ORI5 in, amplifitseeritavaks 280nt pikk mitokondriaalne ORI2 (vt. 2.2.2. Kasutatud praimerid ja PCR reaktsioonid). PCR-produkti töödeldi nagu kirjeldatud punktis 2.2.3. PCR produktide puhastamine.

Filter eelhübridiseeriti 65°C juures. Selleks pandi filter hübridiseerimistorru ja lisati 30ml Church puhvrit (1mM EDTA; 7% SDS; 0,5% BSA; 0,5M NaPO<sub>4</sub> pH=7,5). Toru pandi pöörlema (pöördeid 9 pööret/min) 30 minutiks Quanta Biotech ahju. Enne radioaktiivse proovi lisamist vahetati torus hübridatsioonilahus. Radioaktiivne proov keedeti 95°C juures 5 minutit. Seejärel jahutati proov jääl ja tehti 15-sekundiline tsentrifuugimine. Proov pandi hübridiseerimistorru nii, et see ei puutunud otse kokku filtriga, toru loksutati ja jäeti pöörlema

üleöö (65°C, 9 pööret/min). Hommikul koguti radioaktiivne vedelik 50ml-sse tuubi ja visati radioaktiivsete jäätmete konteinerisse. Tuubi lisati 150ml pesupuhvrit (1mM EDTA; 5% SDS; 40mM NaPO<sub>4</sub> pH=7,5), tehti 2 minutit kiirpesu ning pandi uus pesupuhver ja pandi hübridatsiooni ahju 15 minutiks pöörlema. Visati pesupuhver ära ja korrati protseduuri. Seejärel filter tupsutati paberrätikuga kuivemaks ja pandi kilekaante vahele. Filter pandi ilmutuskaante (*Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen*) vahele. Pildi analüüsiks kasutati Typhoon Phosphoimager masinat.

Nukleaarse proovi eemaldamiseks kasutati 45°C juures hoitud 0,4M NaOH. Filter pandi hübrideerimistorru, lisati 100ml 0,4M NaOH-d, pandi pöörlema 45°C juurde ja pesu tehti kaks korda (2x15 minutit, 9 pööret/min). Filter neutraliseeriti SolB-ga (1M Tris (pH=7.5), 1.5M NaCl) vannis loksutades 2x7minutit. Mitokondriaalse proovi hübridiseerimine viidi läbi sarnaselt nukleaarse proovi omaga.



### 2.3. Tulemused ja arutelu

Käesolevas lõputöös uuritakse valgu Mgm101 deletsiooni mõju pagaripärmi mitokondriaalse DNA stabiilsusele. Zuo kaasautoritega (2002) on leidnud, et MGM101 on vajalik pagaripärmi wt rakkude ja  $\text{Np}^-$  hingamismutantide mtDNA säilitamiseks, aga pole vajalik HSp<sup>-</sup> mutantidele. Selles töös kasutati pärmitüve CS6, millest loodi Mgm101 mutandid transformatsiooniga LiOAc-dimetüülsulfoksiidi meetodil ning mutante uuriti *Southern blot* meetodil. Esmalt uuriti Mgm101 mõju hüpersupressiivsetes - HSp<sup>-</sup>15, HS416 ja HSp<sup>-</sup>20 - mutantides, mis sisaldavad vastavalt ori2, ori3 ja ori5 järjestust ja amplifitseeritud mtDNA fragmendi suurused olid vastavalt 1.9, 0.7 ja 2.1kb. Nendes tüvedes säilis mtDNA vaatamata MGM101 geeni deletsioonile (vt. Lisa 3). Veel uuriti Mgm101 vajalikkust *ori/rep* järjestuseta  $\rho^-$  tüvedes E3, DS400/A3, ja DS400/N1, mille amplifitseeritud mtDNA fragmendi suurused olid vastavalt 1.6, 1.8 ja 0.43kb. Selgus, et E3 ja DS400/A3 tüvedes kaotasid kõik (15 isolaati) Mgm101 defektsed kloonid oma mtDNA täielikult (vt. Lisa 4, A). DS400/N1 puhul küll vähenes kõigil 12 isolaadil mtDNA tase 8-21%, aga ülejäänud mtDNA säilis (vt. Lisa 4, B).

Seega lähtub seni avaldatud töödest, et valk Mgm101 on tähtis wt ja *ori/rep* järjestuseta  $\rho^-$  mutantidele, aga pole vajalik HSp<sup>-</sup> tüvedele. Zuo *et al.* 2002. aastal avaldatud töö on seni ainuke, mis uurib MGM101 geeni deletsiooni mõju  $\rho^-$  rakkude mtDNA stabiilsusele.

Oma töös otsustasime kasutada kahte w303  $\rho^-$  tüve – A11 ja A1184, mis Tiina Sedmani katsete järgi on vastavalt 93% ja 97% hüpersupressiivsed. Need tüved valisime, sest nad sisaldavad *ori/rep*-järjestusi ning neid on eelnevalt kasutatud Üldise ja mikroobibiokeemia laboris katsete tegemiseks (Sedman *et al.*, 2014). Nende genoom on sekveneeritud (vt. Lisad 1 ja 2). Katses kasutatud tüvede mtDNA fragmendi suurus on vastavalt 1790nt ja 1184nt ja on teada, et sellise suurusega tüvedes on mtDNA stabiilsem kui suurema mtDNA fragmendiga tüvedes. Minu töös kasutatavad tüved erinevad üksteisest veel selle poolest, et sisaldavad erinevaid *ori/rep*-järjestusi. A11 tüves on ori3 ning A1184 tüves ori2 ja osaline ori7. *Ori/rep*-järjestuste paiknemist vaata jooniselt 1. Zuo *et al.* 2002.aasta töös kasutasid uurijad mutante, mis pärinesid CS6 tüvest, minu uuritud  $\rho^-$  tüved olid pärit w303-st. Seega soovisime nende katsetega uurida, kas Mgm101 valgu deleteerimine erinevates pärmitüvedes annab sarnase või erineva tulemuse.

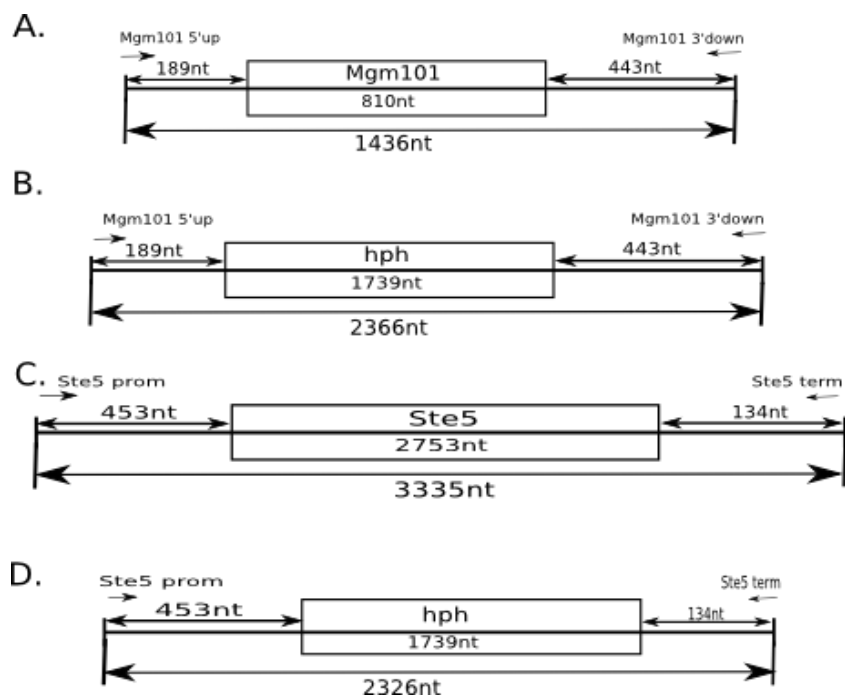


### 2.3.1. MGM101 ja STE5 geenide deletsioonitüvede valmistamine HSp<sup>-</sup> tüvedes

Selleks, et uurida Mgm101 deletsiooni mõju *ori/rep*-järjestustega tüvedes, tegin A11 ja A1184 tüvedest Mgm101 deletsioonitüved. Lisaks deleteerisin samadest tüvedest Ste5 valgu, et vältida transformatsiooni või *hph* resistentsusgeeni mõjutuste tõlgendamist tulemustena. Sarnaselt Zuo *et al.* 2002 tööle kasutasin deletsioonitüvede valmistamiseks LiOAc-dimetüülsulfoksiidi meetodit ning mutante uurisin *Southern blot* meetodiga.

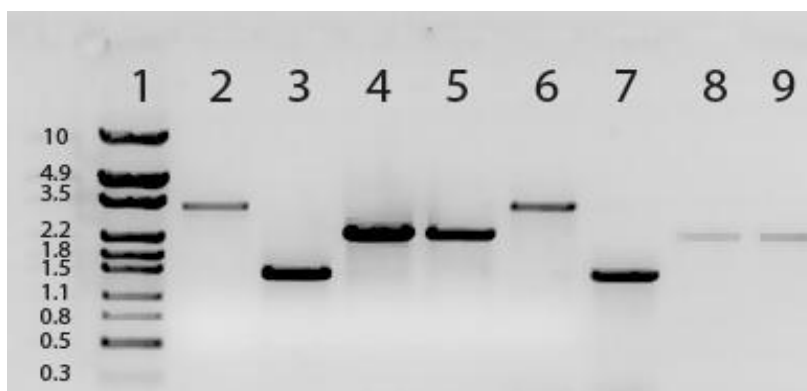
Deletsioonitüvede kontrolli teostas YPD *hph* tassidel, kus said kasvada vaid rakud, milles oli toimunud *hph* resistentsusgeeni integratsioon. Tüvede õigsust kontrollisin PCRi ja agarosgeelelektroforeesiga, et näha, kas MGM101 geen on asendunud *hph* resistentsusgeeniga. Tüvede kontrollimiseks kasutasin kolme erinevat praimeritepaari (vt. Joonised 8-13 ja Tabel 3). Praimeripaaride seondumissaidid on kujutatud joonistel 8, 10 ja 12. Tulemused on kujutatud joonistel 9, 11 ja 13.

Esimesena analüüsisin tüvesid kasutades joonisel 8 näidatud primereid. PCR-ga saadud fragmente analüüsisin agarosgeelil. Sünteesitud PCR-i fragmendid on näidatud joonisel 9.



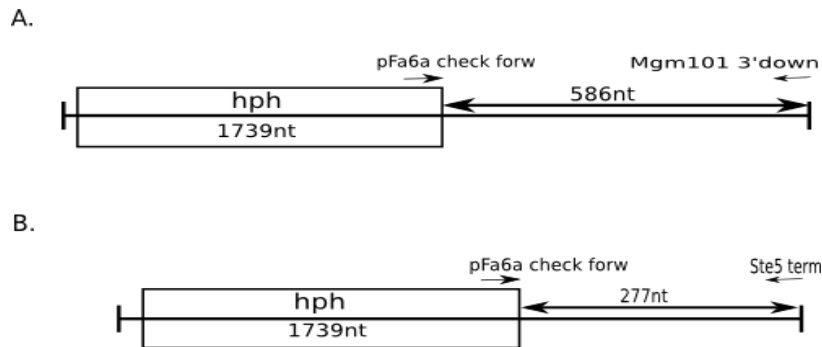
**Joonis 8. Praimerite seondumiskohad HSp<sup>-</sup> A11 ja A1184 tüvede DNA-le.** **A.** MGM101 geen on 810nt pikk, selle ette kinnitub pärisuunaline Mgm101 5' up ja järele vastassuunaline praimer Mgm101 3'down, PCR-ga tekib 1436nt pikkune fragment. **B.** MGM101 geen fragment on asendatud *hph* geeni sisaldava fragmendiga (joonisel siin ja edaspidi *hph*), PCR-ga tekib 1655nt pikkune fragment. **C.** STE5 geen on 2753nt, selle ette kinnitub pärisuunaline

praimer Ste5 prom ja järele vastassuunaline praimer Ste5 term, PCR-ga tekib 3335nt pikkune fragment. **D.** STE5 geen on asendatud hph geeni sisaldava fragmendiga (1023nt), PCR-ga tekib 2326nt pikkune fragment.

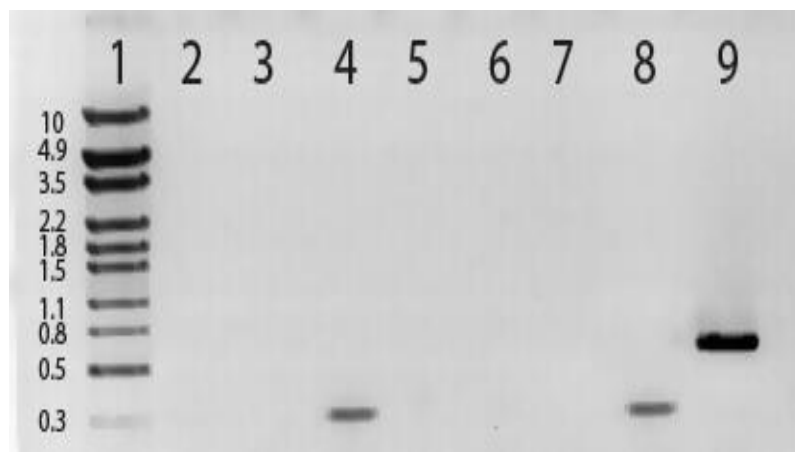


**Joonis 9. PCR fragmentide kontroll agarosgeelil.** Tegemist on kontrollgeeliga, kus ka wt annab produkti. **1.** rajal on marker mix5 (valmistajaks Maie Loorits). **2.-5.** rajal on A11 tüvi ja **6.-9.** rajal A1184. **2. ja 6.** rajal on STE5 (wt 3335 nt PCR fragment), **3. ja 7.** rajal MGM101 (1436 nt wt PCR fragment) , **4. ja 8.** rajal *ste5Δ* (2326nt) ning **5. ja 9.** rajal *mgm101Δ* (2366nt). Praimeritepaariks on Mgm101 up ja Mgm101 down või Ste5 prom ja Ste5 term (vt. Tabel 3).

Joonisel 8 kujutatud praimeripaarid seonduvad meid huvitava geeni ette ja taha, seega amplifitseeritakse üles terve geen koos seda ümbritsevate aladega. Deletsioonitüvede korral on meid huvitav valk asendatud hph resistentsusgeeni fragmendiga. Joonisel 9 on radadel 2-5 analüüsitud tüve A11 ja sellest tehtud mutante ning radadel 6-9 tüve A1184 ja selle mutante. Geeni STE5 (rajad 2 ja 6) wt PCR fragment on 3335nt pikk ning geeni MGM101 (rajad 3 ja 7) wt PCR fragment on 1436nt pikk. Mutantide *ste5Δ* (rajad 4 ja 8) ja *mgm101Δ* (rajad 5 ja 9) PCR fragmendid on vastavalt 2326nt ja 2366nt pikad. Jooniselt 9 on näha, et saadud fragmentide suurused on kooskõlas joonisel 8 kujutatuga. Kuigi tulemused olid ootuspärased, otsustasin kasutada veel kahte praimeritepaari, et olla täiesti kindel tüvede õigsuses. Järgmisena kasutasin pärisuunalist pFa6a praimerit ja vastassuunalisi Ste5 term või Mgm101 3'down praimereid, mis kinnituvad hph geeni sisaldava fragmendi järele. hph kasseti integratsiooni korral tekib 277nt pikkune fragment. Vaata jooniseid 10 ja 11.



**Joonis 10. Praimerite seondumiskohad HSp<sup>-</sup> A11 ja A1184 tüvede DNA-le. A.** *mgm101Δ* tüve kontroll. hph geeni sisaldava fragmendi järele kinnituvad pärisuunaline praimer pFa6a check forw ja vastuvoolu Mgm101 3'down, tekib 586nt pikkune produkt. **B.** *ste5Δ* tüve kontroll. hph geeni sisaldava fragmendi järele kinnituvad pärisuunaline praimer pFa6a check forw ja vastuvoolu Ste5 term, tekib 277nt pikkune produkt.



**Joonis 11. PCR fragmentide kontroll agarosgeelil.** 1. rajal on marker mix5. 2.-5. rajal on A11 tüvi ja 6.-9. rajal A1184. 2. ja 6. rajal on Ste5, 3. ja 7. rajal Mgm101, 4. ja 8. rajal *ste5Δ* (277nt) ning 5. ja 9. rajal *mgm101Δ* (586nt). Praimeriteks on Mgm101 3'down või Ste5 term ja pFA6a check forw (vt. Tabel 3).

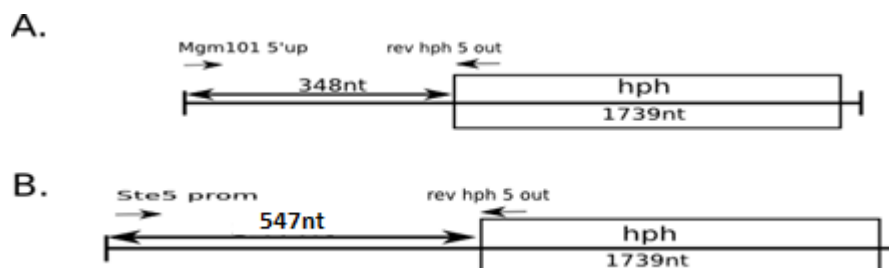
Joonisel 11 tekib PCR produkt tekib vaid juhul, kui hph resistentsusgeen on asendanud meid huvitava geeni (*mgm101Δ* ja *ste5Δ*). Pärisuunalised praimerid seonduvad deleteeritava geeni promootori piirkonda ja vastassuunalised hph resistentsusgeeni mittekodeerivale alale.

Radadel 2-5 on analüüsitud tüve A11 ja sellest tehtud mutante ning radadel 6-9 tüve A1184 ja selle mutante. Jooniselt 10 on näha oodatavad fragmendi pikkused – *ste5Δ* (rajad 4 ja 8) puhul

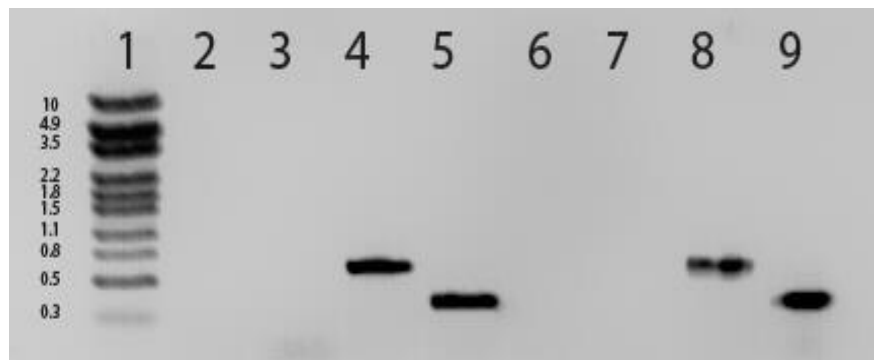
277nt pikkune fragment ja *mgm101Δ* (rajad 5 ja 9) puhul 586nt pikkune fragment. Erinevalt A1184 *mgm101Δ*-st ei saanud A11 *mgm101Δ* tüvest eraldatud DNA-lt produkti (vt. Joonis 11, rida 5). Nagu eeldatud oli, ei olnud võimalik saada wt A11 ja A1184 tüvede (rajad 1 ja 2 ning 6 ja 7) eraldatud DNA pealt PCR-ga produkti, sest praimeril pFA6a check forw pole seondumiskohta wt tüve DNA-le.

Põhjuseks, miks A11 *mgm101Δ* tüvest eraldatud DNA ei andnud praimeriga pFA6a check forw oodatavat PCR-i produkti võib olla see, et pole olemas õiget seondumiskohta või DNA eraldamine ei õnnestunud piisavalt hästi. Proovisin PCR-i produkti saada erinevatel tingimustel mitmel korral, samuti tegi katse läbi juhendaja. Veel proovisin üht teist vastassuunalist praimerit, mis seondub hph fragmendile teise kohta, ent ka see ei andnud A11 *mgm101Δ* tüvest eraldatud DNA-ga produkti. Saadud tulemustest võib siiski arvata, et tegemist võib olla õige tüvega, sest praimeripaariga Mgm101 up ja Mgm101 down tekkis oodatava suurusega produkt (vt. Joonis 8, rida 5).

Järgmisena analüüsisin deletsioonitüvesid pärisuunaliste Mgm101 5'up või Ste5 prom ja vastassuunalise rev hph 5 out praimeritega, mis seonduvad hph geeni ette. Praimeritepaaride seondumiskohad on näidatud joonisel 12 ja katse tulemus joonisel 13.



**Joonis 12. Praimerite seondumiskohad HSp<sup>-</sup> A11 ja A1184 tüvede DNA-le.** A. *mgm101Δ* tüve kontroll. hph geeni sisaldava fragmendi ette kinnituvad vastassuunaline rev hph 5 out ja pärisuunaline Mgm101 5'up, tekib fragment pikkusega 348nt. B. *ste5Δ* tüve kontroll. hph geeni sisaldava fragmendi ette kinnituvad vastassuunaline rev hph 5 out ja pärisuunaline Ste5 prom, tekib 547nt pikkune fragment.



**Joonis 13. PCR fragmentide kontroll agarosgeelil.** 1. rajal on marker mix. 2.-5. rajal on A11 tüvi ja 6.-9. rajal A1184. 2. ja 6. rajal on *Ste5*, 3. ja 7. rajal *Mgm101*, 4. ja 8. rajal *ste5Δ* (547nt) ning 5. ja 9. rajal *mgm101Δ* (348nt). Praimeriteks on *Mgm101* 5'up või *Ste5* prom ja *hph* rev 5 out. PCR produkt tekib vaid juhul, kui *hph* resistentsusgeen on asendanud meid huvitava geeni (*mgm101Δ* ja *ste5Δ*).

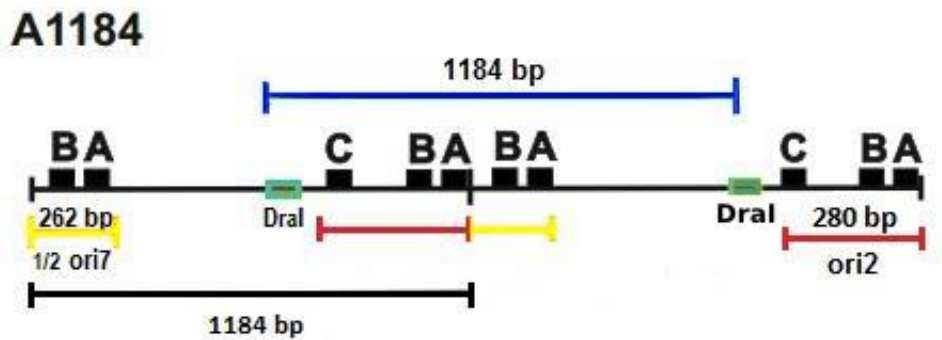
Joonisel 13 seonduvad pärisuunalised praimerid deleteeritava geeni promootori piirkonda ja vastassuunalised *hph* resistentsusgeeni mittekodeerivale alale.

Radadel 2-5 on analüüsitud tüve A11 ja sellest tehtud mutante ning radadel 6-9 tüve A1184 ja selle mutante. Selgus, nagu eeldatud oli, et A11 ja A1184 tüvedel on sünteesitud PCR-i produktid ühepikkused. Sarnaselt joonisele 11 on jooniselt 13 on näha, et wt A11 ja A1184 tüvede (rajad 1 ja 2 ning 6 ja 7) eraldatud DNA pealt ei saadud PCR-ga produkti, sest praimeril rev *hph* 5 out pole seondumiskohta wt tüve DNA-le. Joonisel 12 on näidatud eeldatavad fragmendi pikkused – *ste5Δ* (rajad 4 ja 8) puhul 547nt ja *mgm101Δ* (rajad 5 ja 9) puhul 348nt. Jooniselt 13 on näha, et tõepoolest on fragmendid eeldatud pikkusega, järelikult on *hph* geeni fragmendi integratsioon toimunud õigesse kohta. Neid kontrollitud tüvesid otsustasime kasutada mtDNA analüüsiks.

### 2.3.2. Tüve A1184 ning deletsioonimutantide DNA analüüs

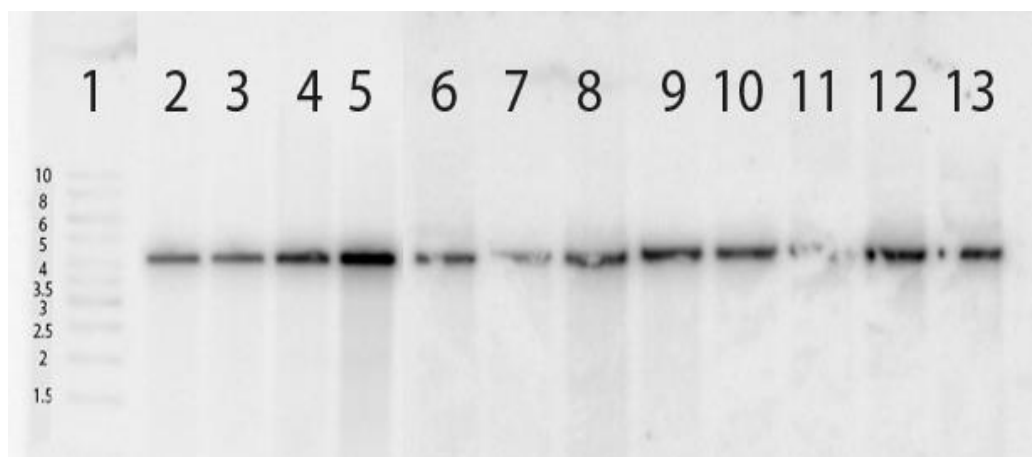
Esimesena analüüsisin A1184 tüve, mis sisaldab 1184nt pikkust mtDNA fragmenti ja on 97% (Tiina Sedmani katsetest) HSp<sup>-</sup> tüvi. Selle tüve mtDNA sisaldab aktiivset ori2 ja osaliselt ori7 järjestust. Tüvi on valmistatud Karin Villemsoni poolt 2013. aastal.

Tüvest A1184 valmistasin *ste5Δ* ja *mgm101Δ* mutandid. *mgm101Δ* uurimiseks kasvasin uuritavad tüved üles YPD tassidel, millelt valisin 8 kolooniat, et neid edasi kasvatada YPD vedelsöötmes. Üleskasvanud rakkudest eraldasid DNA, mida lõikasin *DraI* restriktasiga (vt. Joonis 14).



**Joonis 14. A1184 tüve mtDNA fragmendi skeem.** Restriktaasi DraI lõikekoht on märgitud rohelisega. Punasega on märgitud ori2 ja osaline ori7 kollasega, mtDNA restriksioonil tekkiv fragment on märgitud sinisega. a1184 ühe mtDNA fragmendi pikkus musta joonena. A, B ja C G/C plokkide seletust vaata jooniselt 2. Joonis pärineb Tiina Sedmanilt ja on modifitseeritud autori poolt.

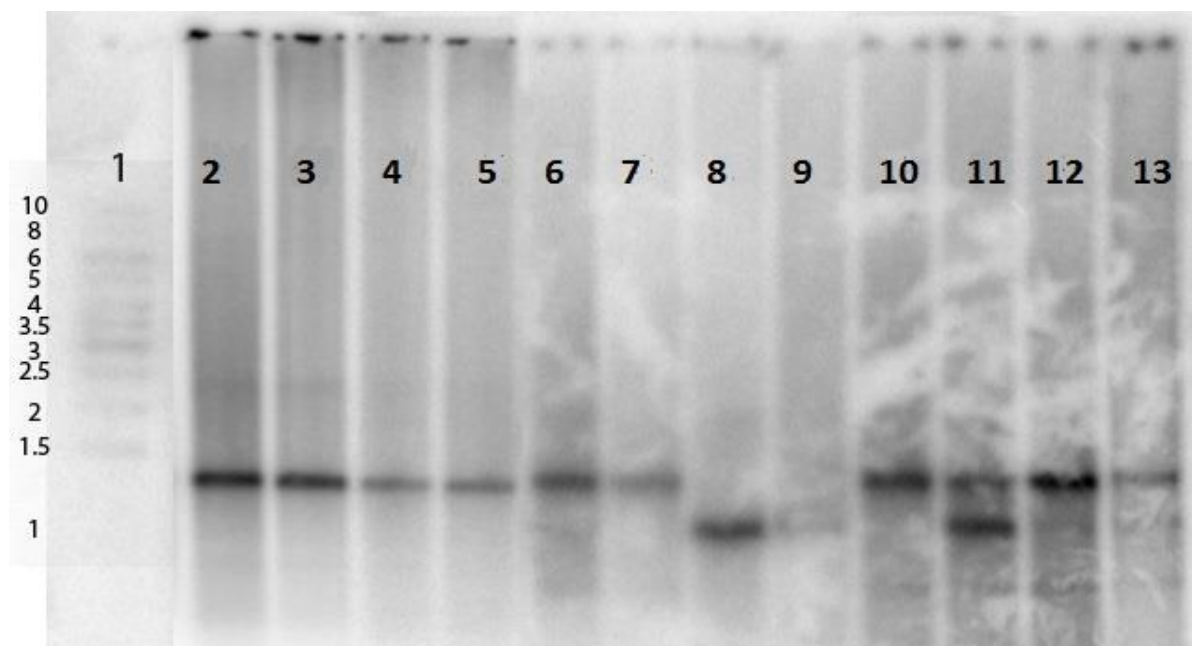
Restriksioonifragmendid eraldasid agarosegeelil (0,7%) ja kandsin positiivselt laetud nailonfiltrile. Selleks, et olla kindel, et DNA eraldamine oli õnnestunud, kasutasin esiteks nukleaarset proovi. Selleks oli radioaktiivselt märgistatud 359nt pikkune fragment DNA2 geenist. Joonisel 15 on 2.-3. rajal A1184 (wt), 4.-5. rajal A1184 *ste5Δ* ja 6.-13. rajal on A1184 *mgm101Δ*. Pärast hübridiseerimist ja filtri skaneerimist oli näha, et kõigis proovides on olemas DNA (vt Joonis 15). Seega oli DNA eraldamine olnud edukas.



**Joonis 15. A1184, A1184 *ste5Δ* ja A1184 *mgm101Δ* tüvede DNA analüüs nukleaarse prooviga.** Esimesel rajal on marker 1kb (*Thermo Scientific*), 2.-3. rajal on A1184 (wt), 4.-5. rajal A1184 *ste5Δ* ja 6.-13. rajal on A1184 *mgm101Δ*. Fragmendi suurus on 4601nt. Filtri ilmutusaeg oli 24 tundi.

Selleks, et teada saada, milline on a1184 tüve mutantide mitokondriaalne DNA, eemaldasid radioaktiivse nukleaarse proovi ja hübridiseerisin samu filtreid mitokondriaalse prooviga, milleks oli 280bp pikkune *ori*-järjestuse fragment.

Tüve A1184 wt  $\rho^-$  ja *ste5Δ* tüvest eraldatud DNA-d on esitatud joonistel vaid kahes korduses. Vähesed kordused on tingitud asjaolust, et A1184 wt  $\rho^-$  ja *ste5Δ* mtDNA stabiilsust on varasemalt uuritud Karin Villemsoni magistritöös.



**Joonis 16. A1184 ja deletsioonimutantide restriksioonifragmentide analüüs mitokondriaalse prooviga hübridiseerimisel.** Esimesel rajal on marker 1kb, 2.-3. rajal on A1184 (wt) deletsioonideta  $\rho^-$ , 4.-5. rajal A1184 *ste5Δ* ja 6.-13. rajal on A1184 *mgm101Δ*. Wt ja *ste5Δ* fragmendi pikkuseks on 1184bp, mis on ka mõnel *mgm101Δ* näha. Filtri ilmutusaeg oli 24 tundi.

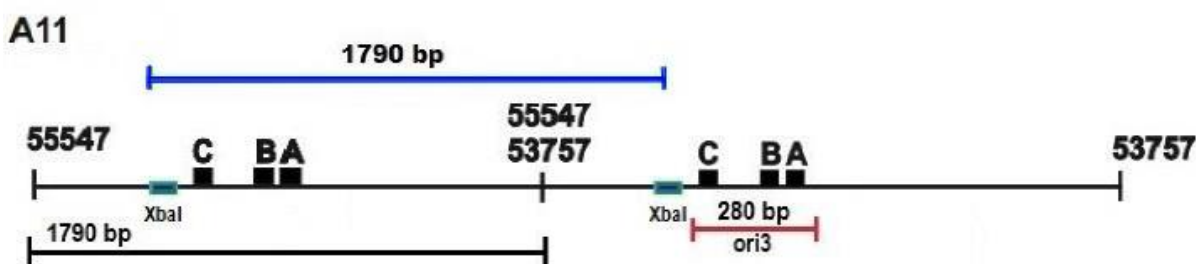
Katsest selgus, et Mgm101 valgu deletsioon põhjustab mtDNA ebastabiilsust – tekivad erinevate suurustega fragmendid (vt Joonis 16 read 8,9,11-13). See viitab mitokondriaalses genoomis toimunud ümberkorraldustele, mis on liigutanud DraI lõikekohta ja seega muutnud restriksioonifragmentide suurust (vt. Joonis 14). Nagu eeldatud, oli A1184 wt ja *ste5Δ* puhul mtDNA stabiilsus säilinud (fragment suurusega 1184nt). Mgm101 deletsioonitüvedest on 3/8



säilitanud stabiilse mtDNA, seega on HSp<sup>-</sup> tüvi ainult osaliselt võimeline säilitama mtDNA stabiilsuse MGM101 geeni deletsiooni korral.

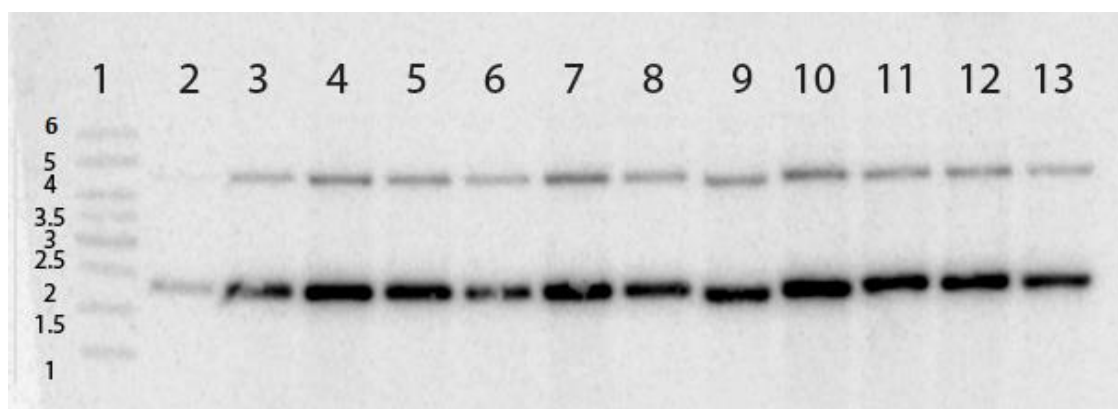
### 2.3.3. Tüve A11 ning deletsioonimutantide analüüs

Järgmisena analüüsisin tüve A11, mis on 1790nt pikkust mtDNA fragmenti sisaldav 93% HSp<sup>-</sup> tüvi ja sisaldab aktiivset ori3. A11, A11 *ste5Δ* ja A11 *mgm101Δ* tüvedest eraldatud totaalselt DNA-d lõikasin restriктаasiga XbaI (vt. Joonis 17). Restriksioonifragmendid kandsin 0,7% agarosgeelilt positiivselt laetud nailonfiltrile.



**Joonis 17. a11 tüve mtDNA fragmendi skeem.** Restriктаasi XbaI lõikekoht on märgitud rohelisega. Punasega on märgitud ori3 ja sinisega mtDNA restriksioonil tekkiv fragment. a11 mtDNA pikkus on märgitud musta joonena. A, B ja C plokkide seletust vaata jooniselt 1. Joonis pärineb Tiina Sedmanilt ja on modifitseeritud autori poolt.

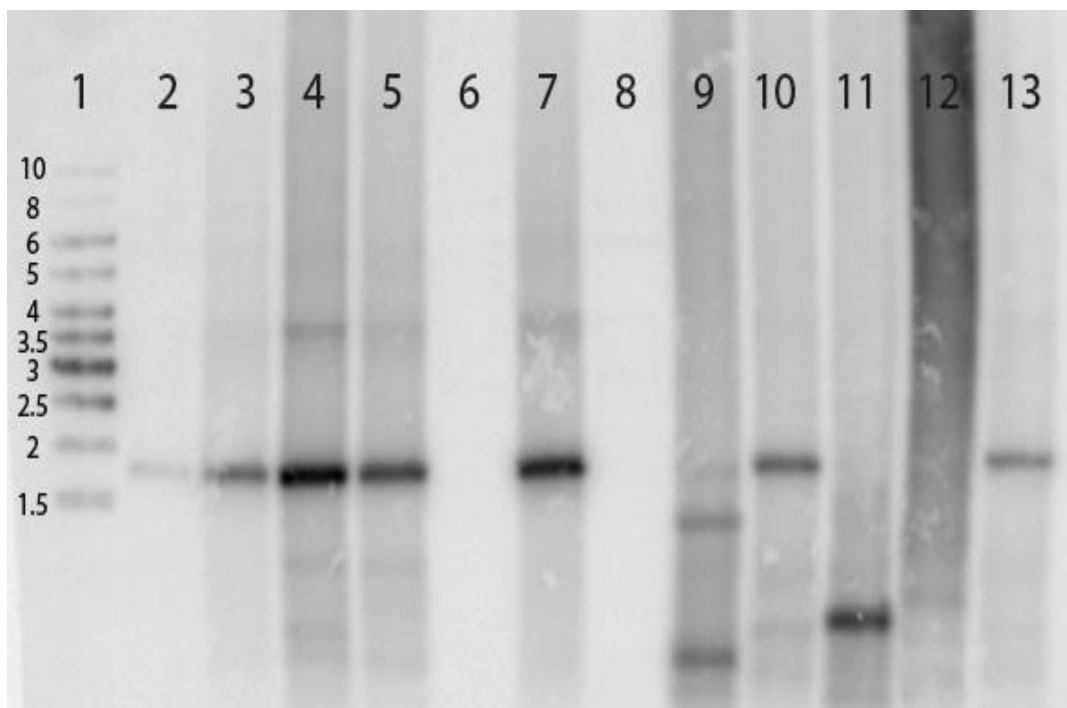
Ka A11 wt ning *ste5Δ* ja *mgm101Δ* mutantsetest tüvedest eraldatud DNA-de puhul oli nukleaarseks prooviks Dna2 lõik. Radadel 2.-3. on analüüsitud A11 wt tüve, 4.-5. rajal A11 *ste5Δ* tüve ja 6.-13. rajal A11 *mgm101Δ* tüve (vt Joonis 18).



**Joonis 18. A11, A11 *ste5Δ* ja A11 *mgm101Δ* tüvede DNA analüüs nukleaarse prooviga.** Esimesel rajal on marker 1kb, 2.-3. rajal A11 wt, 4.-5. rajal A11 *ste5Δ* ja 6.-13. rajal A11 *mgm101Δ*. Fotol on näha kaks fragmenti, millest suurem (4601nt) on meid huvitav fragment ja väiksem (ligikaudu 2200nt) on mittespetsiifiline hübridiseerumine. Filtri ilmutusaeg oli 24 tundi.



Hübridiseerisin ja skaneerisin filtri ning selgus, et kõigis analüüsitud A11 ja mutantide tüvedes oli näha stabiilne nukleaarne DNA (vt. Joonis 18). Nagu A1184 tüve DNA analüüsis pesin ka sellelt filtrilt radioaktiivse nukleaarse proovi maha ja hübridiseerisin sama filtrit mitokondriaalse *ori*-prooviga. Ka A11 wt  $\rho^-$  ja *ste5Δ* tüvesid uurisin vaid kahes korduses, sest Sedman *et al.* (2014) katsetest oli teada, et need on stabiilsed.



**Joonis 19.** A11, A11 *ste5Δ* ja A11 *mgm101Δ* tüvede DNA analüüs mitokondriaalse prooviga. Esimesel rajal on marker 1kb, 2.-3. rajal A11 wt, 4.-5. rajal A11 *ste5Δ* ja 6.-13. rajal A11 *mgm101Δ*. Stabiilse mtDNA fragmendi suurus on 1790nt. Filtri ilmutusaeg oli 24 tundi.

Jooniselt 19 on näha, et stabiilne mtDNA säilis A11 wt ja A11 *ste5Δ* tüvedes. See näitab, et antibiootikumikassett ega Ste5 valgu kaotus ei põhjusta mtDNA fragmenteerumist. A11 *mgm101Δ* mutandi puhul säilis mtDNA kolmes, fragmenteerus kolmes ja kadus sootuks kahes kaheksast proovist (vt. Joonis 19). Fragmenteerunud mtDNA tekib, kui mitokondriaalses genoomis on toimunud ümberkorraldused nii, et on muutunud XbaI lõikekoht ja seega ka restriksioonifragmentide suurus. Proovis 12 pole näha konkreetseid fragmente. Selline olukord tekib, kui restriktiooni XbaI lõikesaidid on üksteisele väga lähedal. mtDNA puudumine kahes proovis võis tuleneda asjaolust, et tegemist oli  $\rho^0$  kolooniatega.

#### 2.3.4. Arutelu

Kirjanduse ülevaatest selgus, et valg Mgm101 on oluline DNA katkestuste parandamisel ja võimalik, et ka telomeeride säilitamisel (Pevala *et al.*, 2016). Ilmselt osaleb Mgm101 homoloogilise rekombinatsiooniga parandamisrajal DSB parandustel (vt. Joonis 5). Samuti on Mgm101 oluline replikatsioonis. Olemasolevate andmete põhjal võib spekuloida, et selleks võiks olla rekombinatsiooni juhitud replikatsioon. *Ori/rep*-järjestusi peetakse replikatsiooni initsiaatoriteks ja seetõttu on nende olemasolu replikatsiooni toimumiseks ülimalt tähtis. Zuo *et al.* näitasid oma 2002. aasta töös, et *ori/rep*-järjestusteta  $Np^-$  mutantide ja geeni MGM101 deletsiooni korral kaotab mtDNA oma stabiilsuse. Nad pakkusid välja, et pagaripärmis võiks olla kaks replikatsiooni initsiaatorimehhanismi – üks, mis sõltub *ori/rep*-järjestustest ja teine, mis sõltub Mgm101 olemasolust (Zuo *et al.*, 2002).

Siiani on valgu Mgm101 deletsiooni mõju mtDNA stabiilsusele uuritud üksnes ühes artiklis (Zuo *et al.*, 2002) ja seda rohkem kui kümme aastat tagasi. Selles artiklis uuriti küll kolme erinevat  $HSp^-$  tüve, ent mtDNA analüüsi tulemustest näidati igast tüvest ainult ühte DNA-d. (vt. Lisa 3). Saamaks teada, millist rolli mängib Mgm101 valgu deletsioon meie õppetooli  $HSp^-$  tüvedes A11 ja A1184, tegin neist deletsioonimutandid ja viisin läbi mtDNA analüüsi kaheksast kolooniast eraldatud DNA-dele kummastki tüvest. Varasemast (Zuo *et al.*, 2002) on teada, et  $HSp^-$  tüvedes säilib mtDNA stabiilsus ja sellist tulemust ootas ka oma tüvede puhul.

Minu katsetest selgus, et  $HSp^-$  tüvede A11 ja A1184 deletsioonimutantides põhjustab geeni MGM101 deletsioon mtDNA ebastabiilsust (mõlema tüve 5/8 kolooniatest oli mtDNA fragmenteerunud või kadunud täielikult). Zuo *et al.* uurisid oma 2002. aasta töös samuti  $HSp^-$  tüvesid, mis erinesid minu uuritutest *ori/rep*-järjestuste sisalduse ja mtDNA fragmendi pikkuse poolest. Samuti oli erinev tüvi, mida deletsioonimutantide saamiseks kasutati (Zuo *et al.* 2002.a katses CS6, meie katses w303). Zuo *et al.* (2002)  $HSp^-$  tüvede mtDNA stabiilsus aga säilis Mgm101 deletsiooni korral (vt. Lisa 3). Minu tüvedel säilis 3/8 kolooniatest stabiilne mtDNA. Seega ei saa samasugust järeldust teha kõigi  $HSp^-$  tüvede kohta.

Tüvede A11 ja A1184 valgu Mgm101 deletsioonimutantide võrdlusest selgus, et A11 omades on mtDNA vastuvõtlikum deletsioonidele, sest seal kadus kahes proovis mtDNA täielikult (vt. Joonis 19). Põhjuseks võib olla see, et A11 mtDNA fragment on pikem kui A1184 oma ja varasemast on teada, et lühema fragmendiga mtDNA on stabiilsem. Mõlemas mtDNA fragmendis on palju G/C plokkide, mis võib omakorda olla fragmenteerumise põhjuseks, sest

polümeraas ei suuda neid alati läbi lugeda. Mõlemast katsest saab aga järeldada, et Mgm101 valk on oluline tüvede A11 ja A1184 mtDNA stabiilsuse säilimiseks. Minu tööst järeldus, et üksnes ori/rep-järjestuse olemasolust ei piisa, et Mgm101 deletsioonimutant mtDNA stabiilsuse säilitaks.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti valgu Mgm101 deletsiooni mõju mtDNA stabiilsusele. Valk Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*) koosneb 269 aminohappest ja kaalub 30 kDa (Chen *et al.*, 1993). On leitud, et valk Mgm101 on vajalik mtDNA stabiilsuse säilitamiseks osaledes rekombinatsiooni juhitud replikatsioonis ja ilmselt ka telomeeride säilitamisel (Pevala *et al.*, 2016).

Valgu Mgm101 deletsiooni mõju mtDNA stabiilsusele on varasemalt uuritud Zuo ja kaasautorite (2002) poolt, kes leidsid, et Mgm101 on vajalik pagaripärmi wt rakkude ja  $\text{Np}^-$  hingamismutantide mtDNA säilitamiseks, aga pole vajalik  $\text{HSp}^-$  tüvedele. Kuna see uurimus on tehtud ammu ja rohkem uurimusi pole *mgm101Δ* mutantidega läbi viidud, otsustasin uurida samade meetoditega teisi  $\text{HSp}^-$ -tüvesid.

Tegin oma katsed Üldise ja mikroobibiokeemia laboris valmistatud pagaripärmi  $\text{HSp}^-$  tüvede A11 ja A1184-ga. Need tüved sisaldavad erinevaid *ori/rep*-järjestusi ja erinevad üksteisest mtDNA fragmendi pikkuse poolest. A11 tüves on *ori3* ning A1184 tüves *ori2* ja osaline *ori7*. Tüve A11 mtDNA fragmendi pikkuseks on 1790nt ja A1184 oma on 1184nt pikkune. Mõlemast tüvest valmistasin deletsioonimutandid ja analüüsisin neid *Southern blot*'i meetodiga. Kummastki tüvest võtsin analüüsiks kaheksa *mgm101Δ* kolooniat.

Minu tulemustest järeldus, et valgu Mgm101 deletsioon viib ka  $\text{HSp}^-$  tüvedes mtDNA fragmenteerumiseni. Tüve A11 korral esines 3/8 kolooniatest mtDNA fragmenteerumist ja kahel koloonial oli mtDNA kadunud täielikult. A1184 tüve kolooniatest oli 5/8 fragmenteerunud mtDNA, aga täielikku mtDNA kadumist polnud. Seega on tüvi A11 *mgm101Δ* mutandid vastuvõtlikumad mtDNA deletsioonidele kui A1184 omad. See võib tuleneda asjaolust, et A11 mtDNA fragment on pikem (1790nt) kui A1184 oma (1184nt).

Samuti näitab minu katsetest saadud tulemus, et ka  $\text{HSp}^-$ -tüved vajavad valku Mgm101 mtDNA stabiilsuse säilitamiseks. Zuo *et al.* uurisid oma 2002. aasta töös samuti  $\text{HSp}^-$  tüvesid, kuid need erinesid minu uuritutest *ori/rep*-järjestuste sisalduse, mtDNA fragmendi pikkuse ning genotüübi poolest. Oma katsetes võisin näha mtDNA ebastabiilsust tänu sama tüve mitmete kolooniate uurimisele. Seega võib väita, et valk Mgm101 mõjutab mtDNA stabiilsuse säilimist.

Edaspidi võiks uurida sarnase metoodikaga valgu Mgm101 deletsiooni mõju neutraalsetele tüvedele.

## SUMMARY

### Protein Mgm101 and its deletion impact on stability of the mitochondrial DNA

Varje Kass

Many proteins are required for mtDNA stability. While most organisms cannot cope without mtDNA, *Saccharomyces cerevisiae* can. That's why I chose it to be my thesis's model organism.

Protein Mgm101 is 269 amino acids long and has molecular weight 30 kDa. Mgm101 stands for mitochondrial genome maintenance. It plays a role in mtDNA binding, repair and duplication. Meeusen *et al.* (1999) showed that Mgm101 is required for the repair of oxidatively damaged mtDNA.

According to mtDNA content, the baker's can be either a  $\rho^+$ ,  $\rho^-$  ja  $\rho^0$  strain.  $\rho^+$  strains are wild-type, containing normally functioning mtDNA,  $\rho^-$  strains have truncated version of mtDNA and  $\rho^0$  strains have completely lost their mtDNA.  $\rho^-$  is furthermore divided into hypersuppressive, suppressive and neutral type depending on which kind of progeny it gives after matings with a wild-type strain. Hypersuppressive  $\rho^-$  gives up to 100%  $\rho^-$  offsprings, suppressive gives both  $\rho^-$  and wild-type and neutral  $\rho^-$  gives only wild-type offsprings.

Zuo *et al.* (2002) showed that Mgm101 is needed for stability of mtDNA in wild-type strains and neutral  $\rho^-$  mutants, but is not needed for hypersuppressive mutants.

In my thesis I chose to analyze two hypersuppressive  $\rho^-$  strains (A11 and A1184), of which I made deletion strains of Mgm101 and as control *Ste5*. In both deletion and wild-type strains the nuclear DNA was stable. In wild-type and *ste5 $\Delta$*  strains the mtDNA was also stable, but in *mgm101 $\Delta$*  strains the mtDNA was fragmented or absent in a large fraction of colonies.

Therefore, it can be concluded that Mgm101 is very important not only in neutral mutants and wild-type strains, but also for hypersuppressive  $\rho^-$  strains.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity--Critical Analysis and Update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012641–a012641.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Baldacci, G., and Bernardi, G. (1982). Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 1, 987–994.
- Baute, J., and Depicker, A. (2008). Base Excision Repair and its Role in Maintaining Genome Stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43, 239–276.
- Blanc, H., and Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3942–3946.
- Bogenhagen, D., and Clayton, D.A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11, 719–727.
- Botstein, D., and Fink, G. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* 240, 1439–1443.
- Burgers, P.M., Stith, C.M., Yoder, B.L., and Sparks, J.L. (2010). Yeast exonuclease 5 is essential for mitochondrial genome maintenance. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1457–1466.
- Chance, B. (1963). Localization of intracellular and intramitochondrial compartments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 108, 322–330.
- Chen, X.J. (2013). Mechanism of Homologous Recombination and Implications for Aging-Related Deletions in Mitochondrial DNA. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 476–496.
- Chen, X.J., and Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815–825.
- Chen, X.J., Guan, M.X., and Clark-Walker, G.D. (1993). MGM101, a nuclear gene involved in maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21, 3473–3477.
- Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., and Butow, R.A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714–717.
- Chi, N.W., and Kolodner, R.D. (1994). Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *J. Biol. Chem.* 269, 29984–29992.
- Clark-Walker, G.D., and Chen, X.J. (1996). A vital function for mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 746–750.

- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693–705.
- Contamine, V., and Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 64, 281–315.
- De Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., and Bernardi, G. (1984). The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32, 439–457.
- Diffley, J.F., and Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7864–7868.
- Drubin, D. (1989). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for the cytoskeleton and cellbiology. *Cell Motil. Cytoskeleton* 14, 42–49.
- Ephrussi, B., and Grandchamp, S. (1965). Studies on the suppressivity of respiratory-deficient yeast mutants. *Heredity* 20, 1–7.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 264, 20552–20560.
- Foury, F., and Lahaye, A. (1987). Cloning and sequencing of the PIF gene involved in repair and recombination of yeast mitochondrial DNA. *EMBO J.* 6, 1441–1449.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440, 325–331.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F., and Daum, G. (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 214–220.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A.M., and Spelbrink, J.N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell* 14, 1583–1596.
- Gerhold, J.M., Aun, A., Sedman, T., Jöers, P., and Sedman, J. (2010). Strand Invasion Structures in the Inverted Repeat of *Candida albicans* Mitochondrial DNA Reveal a Role for Homologous Recombination in Replication. *Mol. Cell* 39, 851–861.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.
- Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L., and Christianson, T.W. (1998). Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 26, 1309–1316.

- Grossman, L.I., Cryer, D.R., Goldring, E.S., and Marmur, J. (1971). The petite mutation in yeast. 3. Nearest-neighbor analysis of mitochondrial DNA from normal and mutant cells. *J. Mol. Biol.* 62, 565–575.
- Hermann, G.J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 265–303.
- Heude, M., Fukuhara, H., and Moustacchi, E. (1979). Spontaneous and induced rho mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: patterns of loss of mitochondrial genetic markers. *J. Bacteriol.* 139, 460–467.
- Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M., and Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.* 152, 401–410.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515–524.
- Hyman, B.C., Cramer, J.H., and Rownd, R.H. (1982). Properties of a *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA segment conferring high-frequency yeast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1578–1582.
- Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Maeda-Sano, K., Shirai, Y., Kanaoka, M.M., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., *et al.* (2011). DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Mitochondrion* 11, 575–586.
- Jemt, E., Farge, G., Backstrom, S., Holmlund, T., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2011). The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 39, 9238–9249.
- Kalifa, L., Quintana, D.F., Schiraldi, L.K., Phadnis, N., Coles, G.L., Sia, R.A., and Sia, E.A. (2012). Mitochondrial Genome Maintenance: Roles for Nuclear Nonhomologous End-Joining Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 951–964.
- Kaniak-Golik, A., and Skoneczna, A. (2015). Mitochondria-nucleus network for genome stability. *Free Radic. Biol. Med.* 82, 73–104.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* 6, e16015.
- Kaufman, B.A., Newman, S.M., Hallberg, R.L., Slaughter, C.A., Perlman, P.S., and Butow, R.A. (2000). In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7772–7777.
- Kleff, S., Kemper, B., and Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* 11, 699–704.
- Kominsky, D.J., and Thorsness, P.E. (2000). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* gene YME1 in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* converts it to petite-



positive. *Genetics* 154, 147–154.

Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* 23, 2423–2429.

Kucej, M., and Butow, R.A. (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol.* 17, 586–592.

Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 1491–1508.

Ling, F., Hori, A., and Shibata, T. (2007). DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho-] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1133–1145.

Ling, F., Makishima, F., Morishima, N., and Shibata, T. (1995). A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. *EMBO J.* 14, 4090–4101.

Ling, F., Morioka, H., Ohtsuka, E., and Shibata, T. (2000). A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA. *Nucleic Acids Res.* 28, 4956–4963.

Lisowsky, T., and Michaelis, G. (1989). Mutations in the genes for mitochondrial RNA polymerase and a second mitochondrial transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 219, 125–128.

Lorimer, H.E., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4803–4809.

MacAlpine, D.M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R.A., and Perlman, P.S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 1807–1817.

Macierzanka, M., Plotka, M., Pryputniewicz-Drobinska, D., Lewandowska, A., Lightowlers, R., and Marszalek, J. (2008). Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 107–117.

Maleszka, R., Skelly, P.J., and Clark-Walker, G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10, 3923–3929.

Mbantenkhu, M., Wang, X., Nardozzi, J.D., Wilkens, S., Hoffman, E., Patel, A., Cosgrove, M.S., and Chen, X.J. (2011). Mgm101 Is a Rad52-related Protein Required for Mitochondrial DNA Recombination. *J. Biol. Chem.* 286, 42360–42370.

Mbantenkhu, M., Wierzbicki, S., Wang, X., Guo, S., Wilkens, S., and Chen, X.J. (2013). A short carboxyl-terminal tail is required for single-stranded DNA binding, higher-order structural organization, and stability of the mitochondrial single-stranded annealing protein Mgm101. *Mol. Biol. Cell* 24, 1507–1518.

- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **16**, R551–R560.
- Meeusen, S., Tieu, Q., Wong, E., Weiss, E., Schieltz, D., Yates, J.R., and Nunnari, J. (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* **145**, 291–304.
- Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S., and Kuroiwa, T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **88** ( Pt 4), 431–439.
- Nagley, P., and Linnane, A.W. (1970). Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 989–996.
- Nardoizzi, J.D., Wang, X., Mbantenkhu, M., Wilkens, S., and Chen, X.J. (2012). A properly configured ring structure is critical for the function of the mitochondrial DNA recombination protein, Mgm101. *J. Biol. Chem.* **287**, 37259–37268.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863–917.
- Park, C.B., and Larsson, N.-G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* **193**, 809–818.
- Parthasarathi, K., Ichimura, H., Quadri, S., Issekutz, A., and Bhattacharya, J. (2002). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Spatial Profile of Proinflammatory Responses in Lung Venular Capillaries. *J. Immunol.* **169**, 7078–7086.
- Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G.N., and Nielsen, J. (2010). Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res.* **10**, 1046–1059.
- Pevala, V., Truban, D., Bauer, J.A., Košťan, J., Kunová, N., Bellová, J., Brandstetter, *et al.* (2016). The structure and DNA-binding properties of Mgm101 from a yeast with a linear mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2227–2239.
- Pohjoismäki, J.L.O., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.-Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., Cluett, T.J., Goffart, S., Willcox, S., *et al.* (2010). Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *J. Mol. Biol.* **397**, 1144–1155.
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., and Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13214–13227.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., and Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1816–1824.
- Shadel, G.S. (1999). Yeast as a Model for Human mtDNA Replication. *Am. J. Hum. Genet.*

65, 1230–1237.

Solieri, L. (2010). Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends Microbiol.* 18, 521–530.

St. John, J.C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., and Salah, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update* 16, 488–509.

Stumpf, J.D., Bailey, C.M., Spell, D., Stillwagon, M., Anderson, K.S., and Copeland, W.C. (2010). mip1 containing mutations associated with mitochondrial disease causes mutagenesis and depletion of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2123–2133.

Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 739–750.

Svilar, D., Goellner, E.M., Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2011). Base Excision Repair and Lesion-Dependent Subpathways for Repair of Oxidative DNA Damage. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 2491–2507.

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25–35.

Thomas BJ and Rothstein R (1989) The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene. *Genetics* 123(4):725-38

Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol. CB* 13, R326–R337.

Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., and Brill, S.J. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J.* 11, 3421–3430.

Villemson, K. (2013). IRC3 valgu mõju mitokondriaalse genoomi stabiilsusele. Tartu Ülikool.

Wilcoxon, S.E., Peterson, C.R., Winkley, C.S., Keller, M.J., and Jaehning, J.A. (1988). Two forms of RPO41-dependent RNA polymerase. Regulation of the RNA polymerase by glucose repression may control yeast mitochondrial gene expression. *J. Biol. Chem.* 263, 12346–12351.

Willer, M., Rainey, M., Pullen, T., and Stirling, C.J. (1999). The yeast CDC9 gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Curr. Biol. CB* 9, 1085–1094.

Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat. Rev. Genet.* 3, 475–481.

Zuo, X.M., Clark-Walker, G.D., and G. Desmond, X.J. (2002). The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of rho(+) and ori/rep-devoid petite genomes but is not required for hypersuppressive rho(-) mtDNA. *Genetics* 160, 1389–1400.

### **Kasutatud veebiaadressid**

<http://www.euroscarf.de/>

<http://www.nacalai.co.jp/global/index.html>

<http://www.yeastgenome.org/>

<https://www.hartmann-analytic.de/>

<https://www.thermofisher.com>

## LISAD

### Lisa 1. A11 fragmendi järjestus (saadud juhendajalt)

53757 TCTT

53761 TTTTCTATTT ATTAATAATA ACTATAAATT ATATTTAAAA TAATAATTTA CTTGTTATAA

53821 TCTTAATGTT CCGGGGCCCG GCCACGGGAG CCGGAACCCC GAAAGGAGAA  
GTATATAAAT

53881 ATTTACTTGT TATAATTTAT TATATATTTA TAACCTCCTT CTAAAAATTA TCTTTACTTT

53941 ATAATAAAAA TTAATATAAT ATAATCTGAT AATAATCGAA TTTTATTATA TTAAATTTAA

54001 TTAATAATAG ACAATTATTA TTATTATTTT ACTTATTAAT ATTAATTTAG ATTTATATAT

54061 ATAAATATTA TTAATTTTAT ATTAATTTT TATTAATTAT TTATTTTAT ATTCATATTT

54121 TTTATTAATA TTATTTTAT TAATAACTTT TTAAATAATT ATAACTATA TATTATTTAT

54181 ATTTATATTT ATAATAAATG AAACAATTAT AATAAAAATT ACAATTACAA TTATATTATA

54241 ATTATGATTA CAATAGGGTT AACATTACC TGTGAACAAC TGGTAATGTT TAACCCGTAT

54301 TATTATTTAT TATATTATAT ATATATTAAA ATATTAATAT TAATATTAAT ATTATATTAT

54361 ATTATATTAT ATTATATTAT ATTATATTAT ATTATATTTA TAATTATATT ATATTATATA

54421 ATTTATATAC TTTTATAATT CTTATTATTA TTTATTTATT ATTTATTTAT TATTATTTAA

54481 ATATATTATT ATTATATATT AATAATATAT ATATTATTTT ATATATTTTA TTAAATATAA

54541 ATTATTTATA TTTTATATT TTATTATGAG GGGGGGTCCC AATTATTATT TTCAATAATA

54601 ATTTATCATG GGACCCGGAT ATCTTCTTGT TTATCATTTA TTATTCCTTAT TATTGGTTT

54661 TTATTTAATA TTTATAATTT ATTTTATACA ATTTATTATA TTGTTTATAC CTTATTATTA

54721 TTATATAATA TATTATATTA TTATAATAAT TTAATTAATT ATATTATTAA ATATTAACTA

54781 ATGTGTGCTC TATATATATT ATTCATTCTA GTTCTAATC ACCCACCCCC TCCCCCTATT

54841 ACTTATATAT TCTAGA AATAA AAATACATAA CATATATTTT AAATATATAT ATATAATTAT

54901 ATAATAATTA TTATATATAA AATATATATA TATATAATAT ATATTTATAA AATAATAATA

54961 ATAAATATTA TTAATCCATT AGAGGTTTTG GTCCCATATC AGGAACCGAA ACTATAATAA

55021 TATATAATAT TATAATAAAG ATATTCTTAT TTATAATATA TTATTAAATA AATTAATAAT

55081 AATTATAATA TATATATATA ATATATTATA ATATATTTAT TCGAGAACTT TTTATTTATT

55141 ATAAAATAAA ATATTTTATT TATTATTTAG TTTTTTTTTT TTAAACATTT TATAAAAATA

55201 TAAATGTAA TAATATTATG ATTAATAAGT AATAATAAAT TTATTTATTT TTATTAATTA

55261 CTTCTTCGAG GTATTAGTAT CAGTATCAGT ATCAGTATCG TAAAAACGG GTGACTAAAA

55321 TATATATATA TATAAAATTA TAAATAAAAA TATTATAATA ATTTTAAATA AATAAATATC

55381 AATATATTAT TATTATTTAT ATTATAATAA ATATTATCTA ATAATAGTCC GGCCCGCCCC

55441 CGCGGGGCGG ACCCCGAAGG AGTCCGAACC CCTTTTTTAT TTAATTTTAT TTAAAGAAGG

55501 AGTGAGGGAC CCTCCCGTT AGGGAGGGGG ACCGAACCCC GAAGGAG 55547

Fragment pärineb wt mtDNA piirkonnast 53757-55547. Fragmendi suuruseks on 1790

aluspaari. Punasega on tähistatud aktiivne ori3, allajoonitud on ori-regiooni A, B ja C plokk.

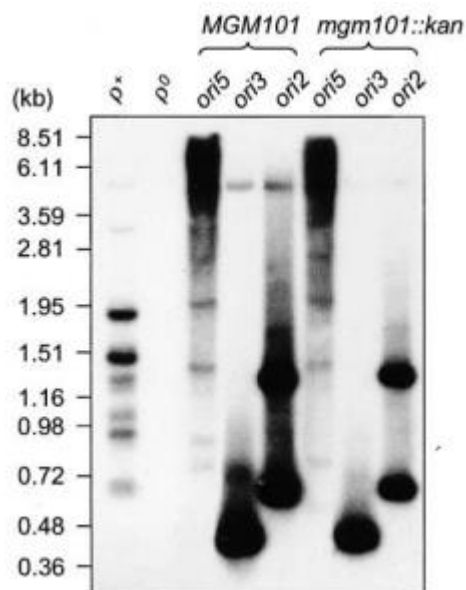
Kasutatud lõikesaidiks on sinisega tähistatud TCTAGA, mida lõikab ensüüm XbaI.

## Lisa 2. A1184 fragmendi järjestus (saadud juhendajalt)

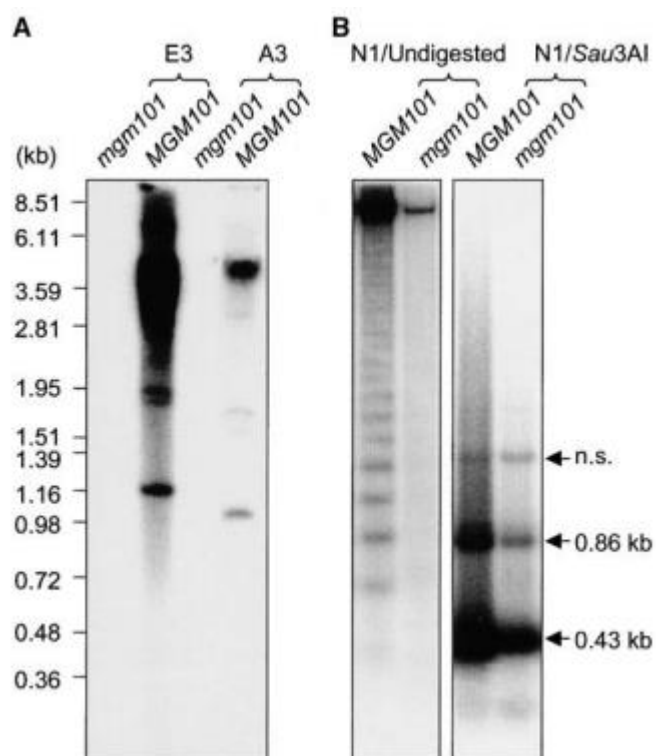
30305 ATAAAA TAAATTAAA ATAATTAATA TATATATATA AATATAATAA ATTATTATAT  
30361 ATAAATATAT ATAATTTTAA TAATAAATAT TATAATATTA TATAAATAAA TAATTATAAT  
30421 ATATAATAAA TATATAATAA TAATAAAAAAT ATTAACAATA TAATAAAAAAT TTATAATATA  
30481 AATATAAATT ATAAATAAGT TAAATTAATA AAATAATAAA TGATTAACAA GAAGATATCT  
30541 GGGGTCCCAT TAATAATTAT TATTTTCAAT AATAATTGGG ACCCCCACC ATTATAATAT  
30601 CATATTAATT AATATAATAA TAATGTATAT AAAATAGAAA TAATAATTAA TATAATAATA  
30661 ATAATATATA TAAATAGAA ATAATAATTA AATATATATA TAAATAATTA TTTATATAAT  
4830721 ATATTATAAA TAATAATAAT AATAAATATT TATTAATTAA TAATGATTAT AAATATTTTA  
30781 TTTAATATAA ATTTATAACT ATTTTATTAT ATATATATTT TTTATTCATA AAAATTCCTT  
30841 TTGAGGATTT TTATTTTATA TAAATATCTT CTAATATTTA TAATAATAA TAATATATTC  
30901 ATTATATTTA TAATTATATA TAAT  
DELTA 1008 NT TATAATTATAAATAATTT ATATAAAAAA  
AGTTTTATTA AAAAATATTA  
31981 TTAAAAATAT AATATTAATA ATAAATAAAA ATAATATTAT ACTCTTAATA GAATTTATAA  
32041 TGATAAAAAT TAAGATGAAG ACTTTTTTTT ATAATTATTA TAAATTTATA TAAAAATAAT  
32101 ATATATATAT TTATATTTAT TTTATTAATA TATATAATAT ATTTATGTAT ATTA AAAAGA  
32161 TATA TTTAAA TATTTTATT TTTTTTTTAT AAGATAATTT TTGTAAATAT ATAAGTAATA  
32221 AATTAAGTTT TATAGGGGGA GGGGGTGGGT GATTAGAAAC TTAAGTGAAT AATATATATA  
32281 AAGCATACAT TAGTTAATAT TTAATAATAT AATCAATATA TAATAATTAT AAAATAATTA  
32341 ATTATATAAT AATAATAATG TATAACAAT ATAATAAATT GTATAAATA AAATATAAAT  
32401 CATAAATAAA GCTAAATTAA TAAATAATA AATGATAAAC AAGAAGATAT  
CCGGGTCCCA  
32461 ATAATAATTA TTATTGAAAA TAATAATTGG GACCCC 32498

Antud fragment pärineb wt mtDNA piirkonnast 30305-32498bp. Fragmendi suurus on 1184 aluspaari. Fragment sisaldab funktsionaalset ori2 (tähistatud rohelisega; A, B ja C plokk on tähistatud allajoonitult) ja poolikut ori7 (tähistatud punasega, A, B ja C plokk on tähistatud allajoonitult). Delta 1008 nt tähistab 1008 aluspaari suurust deletsiooni. Kasutatud lõikesait on märgitud sinisega ja seda lõikab DraI.

**Lisa 3.** HSp<sup>-</sup> tüvede mtDNA stabiilsuse säilimine valgu Mgm101 deletsiooni korral. (Zuo *et al.*, 2002)



**Lisa 4.** Np<sup>-</sup> tüvede mtDNA ebastabiilsus valgu Mgm101 deletsiooni korral. (Zuo *et al.*, 2002)



## **LIHTLITSENTS**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Varje Kass (sünnikuupäev 30.09.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Valk Mgm101 ja selle deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele”, mille juhendaja on Tiina Sedman (PhD)
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2015